



**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Medicina**



**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN**  
**Laboratorio de Biología Molecular**

# **Brucelosis crónica y persistencia de ADN de *Brucella melitensis***

---

## **Tesis Doctoral**

María Jesús Castaño Aroca

Madrid 2010

### **Directores de tesis:**

Dr. Francisco Arnalich Fernández  
Dr. Javier Solera Santos





**D. Francisco Arnalich Fernández**, Catedrático de Medicina Interna de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Sección de Medicina Interna del Hospital Universitario La Paz, y **D. Javier Solera Santos**, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete y Profesor Asociado de Medicina de la Universidad de Castilla La-Mancha,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado: "**Brucelosis crónica y persistencia de ADN de *Brucella melitensis***", ha sido realizado por **D<sup>a</sup> María Jesús Castaño Aroca** bajo nuestra dirección en la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete y consideramos que reúne los requisitos necesarios de calidad y rigor científico para que pueda ser defendido en la Universidad Autónoma de Madrid y optar al grado de Doctor por dicha Universidad.

Fdo: Francisco Arnalich Fernández

Madrid, a 18 de Septiembre de 2010

Fdo: Javier Solera Santos

El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Investigación del Hospital General Universitario de Albacete, bajo la dirección del Dr. Francisco Arnalich Fernández y del Dr. Javier Solera Santos, gracias a una beca de la Consejería de Sanidad de la Junta de Comunidades de Castilla La-Mancha (JCCM) para Jóvenes Investigadores (MOV-2007\_JI/05), a la Red Temática: “Red para la investigación de la Brucelosis” (G03/204) financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria y a los proyectos de investigación PI2006/43 y PI2007/27 de la JCCM.

---

## Agradecimientos

He tenido la suerte de contar con los doctores Javier Solera Santos en Albacete y Francisco Arnalich Fernández en Madrid. A Javier, que me dio la oportunidad de empezar a desarrollar este trabajo, gracias por confiar siempre en mí y por contagiarme tu incansable curiosidad científica. A Francisco, mi más sincero agradecimiento por tu amabilidad, disponibilidad y buen criterio.

Gracias a mi compañera de viaje, la Dra. Elena Navarro García, porque después de todos los momentos vividos me quedo con los buenos recuerdos. Gracias por todo lo que me has enseñado dentro y fuera del laboratorio y por mostrarme siempre tu apoyo y el lado positivo de la vida.

Con cariño deseo dar las gracias por su consejo, su buen juicio, apoyo y experiencia a la Dra. Dolores García Olmo. Gracias por todo lo que has hecho por mí desde un principio y por la desinteresada revisión final de este manuscrito.

Gracias al Dr. Carlos de Cabo por tenderme una mano con las traducciones siempre que lo he necesitado.

Gracias al personal médico y de enfermería de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y del Servicio de Medicina Interna del CHUA por esa tediosa recogida de muestras, en especial a M<sup>a</sup> José Andicoberry, por su simpatía y paciencia y a Juan Carlos Segura por los buenos momentos compartidos. El próximo eres tú, ¡mucho ánimo!.

Gracias al Dr. Ramón Díaz, del Hospital Universitario de Pamplona y a los laboratorios Vircell S.L, por la ayuda prestada en la realización de algunas pruebas serológicas.

Gracias a mis compañeros y amigos presentes y pasados de la Unidad de Investigación, Ángel A. Arriaga, Antonio Rubio, Gemma Serrano, José M. Godínez, Julia Samos, Leticia Serrano, María G. Picazo, Mónica Gómez-Juárez y Pedro J. Benito por esas sonrisas y lágrimas compartidas, por vuestros ánimos y consejos, por enseñarme todo lo que sabeis, por esos sustos en el mortuario, por coronarme “*Miss melitensis*” y mucho más. Quisiera destacar el excelente trabajo técnico de María G. Picazo, porque sin tu ayuda ¡todavía estaría extrayendo muestras!.

Gracias también a esos maravillosos diseñadores gráficos que son mis tíos Pepe Catalán y Raquel Aroca, por la portada de esta Tesis.

Gracias a mis amigas de toda la vida, a mis primas y a Luis, por escucharme cuando lo he necesitado y mostrarme tantos gestos de cariño y admiración.

---



*A mi madre y mi hermana, por confiar en mi y querermme tanto, porque sin vuestro apoyo no hubiera llegado hasta aquí. A toda mi familia y en especial a mi hermano y Mada y sus dos joyitas, mis sobrinos Manuel y Martín. A todos, por hacerme tan feliz.*





# INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
HISTORIA DE LA BRUCELOSIS	19
EPIDEMIOLOGÍA	21
VÍAS DE TRANSMISIÓN	21
DISTRIBUCIÓN MUNDIAL	22
GÉNERO <i>BRUCELLA</i> SPP.	23
CARACTERÍSTICAS GENERALES	23
GENOMA	24
ENVOLTURA CELULAR	26
TAXONOMÍA	28
INMUNOLOGÍA Y PATOGÉNESIS	30
MECANISMOS DE PENETRACIÓN INTRACELULAR	31
MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA INTRACELULAR	32
ANERGIA EN LOS PACIENTES CON BRUCELOSIS CRÓNICA	34
MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y ENFERMEDAD LOCALIZADA	35
BRUCELOSIS AGUDA	36
BRUCELOSIS SUBAGUDA	37
BRUCELOSIS SUBCLÍNICA O ASINTOMÁTICA	37
BRUCELOSIS RECIDIVANTE	37
ENFERMEDAD LOCALIZADA	38
BRUCELOSIS CRÓNICA	42
DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS HUMANA	44
DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO	44
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	46
Rosa de Bengala	47

Seroaglutinación	48
Prueba de Coombs anti- <i>Brucella</i>	49
Otras pruebas serológicas	49
DIAGNÓSTICO MOLECULAR	50
Ensayos de PCR convencional	51
Ensayos de PCR en tiempo real	55
TRATAMIENTO DE LA BRUCELOSIS HUMANA	57
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>65</b>
DISEÑO DEL ESTUDIO	67
SUJETOS	67
GRUPO CONTROL	67
GRUPO DE ESTUDIO	68
Proceso de selección	69
Criterios de inclusión	69
Criterios de exclusión	70
PROTOCOLO GENERAL DE ESTUDIO	70
TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS	71
MATERIAL Y EQUIPAMIENTO DE LABORATORIO	71
PROCESAMIENTO INICIAL DE MUESTRAS	73
PROTOCOLOS DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO	73
HEMOCULTIVO, SEROAGLUTINACIÓN Y COOMBS ANTI- <i>BRUCELLA</i>	73
ROSA DE BENGALA	74
BRUCELLACAPT®	75
EXTRACCIÓN DE ADN	76
ENSAYO DE PCRQtr	78
Cebadores y sonda TaqMan	78
Mezcla de reacción	81
Condiciones de amplificación	81

Cuantificación absoluta	82
Curva externa estándar	83
Precauciones en el control de las contaminaciones	85
RECOGIDA DE DATOS	86
VARIABLES DE ESTUDIO	86
CÁLCULO DE LA CARGA BACTERIANA	87
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	88
DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO	88
ESTUDIO DE LA RELACIÓN O ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES	88
ESTUDIO DE LA CONCORDANCIA ENTRE EL ENSAYO DE PCRQtr EN SANGRE Y SUERO	89
VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DEL ENSAYO DE PCRQtr Y LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS	89
<b>RESULTADOS</b>	<b>93</b>
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DE LABORATORIO DE LOS SUJETOS	95
GRUPO CONTROL	95
GRUPO DE ESTUDIO	95
Grupo A: pacientes con enfermedad focal	97
Grupo B: pacientes con síntomas inespecíficos	103
Grupo C: sujetos asintomáticos	107
Comparación de las características generales entre grupos	112
Pacientes con serología negativa	112
AISLAMIENTO DE <i>BRUCELLA</i> SPP. EN CULTIVO	113
ESTUDIO DEL ENSAYO DE PCRQtr	113
VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DEL ENSAYO DE PCRQtr.	
COMPARACIÓN CON LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS	113
ESTUDIO CUALITATIVO Y DE LA CARGA BACTERIANA BASAL	115
EVOLUCIÓN DE LA CARGA BACTERIANA ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO	116
Grupo A: Pacientes con enfermedad focal	116
Grupo B: pacientes con síntomas inespecíficos	118

COMPARACIÓN DEL ENSAYO DE PCRQtr EN SANGRE Y SUERO	119
Asociación, concordancia y correlación entre la muestra de sangre y suero	119
Comparación de la carga bacteriana media en sangre y suero	120
ESTUDIO DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS	121
COMPARACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS DETECTADO POR LAS PRUEBAS SAT, COOMBS ANTI- <i>BRUCELLA</i> Y BRUCELLACAPT®	121
DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CORTE ÓPTIMO DE LAS PRUEBAS SAT, COOMBS Y BRUCELLACAPT®	122
RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE ADN DE <i>B. MELITENSIS</i> Y LAS INMUNOGLOBULINAS ANTI- <i>BRUCELLA</i>	126
PRUEBAS SEROLÓGICAS REALIZADAS EN VIRCELL S.L	127
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>129</b>
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO	131
UTILIDAD DEL ENSAYO DE PCRQtr Y DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS CLÁSICAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS CRÓNICA	133
PACIENTES CON SEROLOGÍA NEGATIVA	138
IDONEIDAD DEL TIPO DE MUESTRA PARA SU ANÁLISIS MEDIANTE EL ENSAYO DE PCRQtr	139
UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA	140
LIMITACIONES DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA BRUCELOSIS CRÓNICA	142
SIGNIFICADO DE LA PERSISTENCIA DE ADN DE <i>B. MELITENSIS</i>	144
RECOMENDACIONES EN EL USO DEL ENSAYO DE PCRQtr	147
FUTURAS INVESTIGACIONES	148
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>155</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>191</b>
ABREVIATURAS	193
INDICE DE TABLAS	195

INDICE DE FIGURAS	197
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS SUJETOS	199
HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE	223
MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	227
DIFUSIÓN DE RESULTADOS DE ESTA TESIS	229



<b>Autor</b>	María Jesús Castaño Aroca
<b>E-mail del Autor</b>	castanoaroca@yahoo.es
<b>Director(es)</b>	Dr. Francisco Arnalich Fernández, Dr. Javier Solera Santos
<b>Título de la tesis</b>	Brucelosis crónica y persistencia de ADN de <i>Brucella melitensis</i>
<b>Descriptores</b>	Brucelosis crónica, diagnóstico molecular, PCR cuantitativa en tiempo real, <i>Brucella melitensis</i> , sangre, suero.

## RESUMEN

Tras un episodio de brucelosis, una minoría de pacientes puede persistir con síntomas inespecíficos durante más de un año. Ante la ausencia de pruebas de laboratorio objetivas que confirmen la presencia de *Brucella melitensis*, estos pacientes sufren un retraso en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue evaluar la utilidad clínica de la detección y cuantificación de ADN de *B. melitensis* mediante un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (PCRQtr) en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

Se incluyó una cohorte de 38 sujetos con una historia previa de brucelosis, diagnosticada entre 3 y 33 años antes. Atendiendo a la evolución clínica, los sujetos se clasificaron en tres grupos: A (pacientes con enfermedad focal), B (pacientes que presentaban síntomas inespecíficos como fatiga, malestar general, artralgia y/o mialgia) y, C (sujetos asintomáticos). Se obtuvieron un total de 694 muestras (346 de sangre, 344 de suero, una de líquido cefalorraquídeo, una de líquido sinovial, una de médula ósea y una de válvula aórtica). Las muestras se analizaron mediante un ensayo de PCRQtr, las pruebas serológicas clásicas (Rosa de Bengala, seroaglutinación y Coombs anti-*Brucella*) y la prueba serológica no convencional Brucellacapt<sup>®</sup>.

Todos los pacientes con enfermedad focal o con síntomas inespecíficos presentaron ADN de *B. melitensis* en sangre, suero u otro tipo de muestra biológica, frente a un 20% del grupo de sujetos asintomáticos (Prueba exacta de Fisher,  $p < 0,001$ ). Este resultado indica que la detección de ADN de *B. melitensis* mediante el ensayo de PCRQtr, podría ser de utilidad clínica en el diagnóstico de la brucelosis crónica.

Por otra parte, durante la realización del estudio, 11 pacientes recibieron tratamiento antimicrobiano entre 45 y 540 días. El tratamiento antimicrobiano prolongado se mostró como el más eficaz en la resolución de los síntomas y la desaparición del ADN bacteriano.

<b>Titulación</b>	Ldo. Biología
<b>Intensificación</b>	Biosanitaria
<b>Departamento</b>	Medicina
<b>Fecha de presentación</b>	2010





## **INTRODUCCIÓN**

---



La brucelosis es una de las zoonosis más antiguas descritas (Nicoletti, 2002). Históricamente se conoce, entre otros, como Fiebre Recurrente, Fiebre de Malta, Fiebre Mediterránea o Fiebre de Gibraltar en humanos y como aborto infeccioso, aborto contagioso o enfermedad de Bang en animales. De entre todas las especies descritas, *Brucella melitensis* es la más virulenta para el hombre y probablemente la que determine enfermedad crónica con mayor probabilidad (Williams, 1982).

Aunque el término brucelosis crónica se ha utilizado frecuentemente en la literatura, aún no se ha establecido una definición uniforme, consensuada. La controversia en torno a esta enfermedad surge de la dificultad de su diagnóstico. Por un lado, el cuadro clínico es inespecífico y puede confundirse con otras enfermedades. Por otro, los métodos serológicos de rutina aunque son muy eficaces en el diagnóstico del episodio agudo, suelen ser inespecíficos y poco sensibles en estadios avanzados de la enfermedad. Por este motivo, en ausencia de pruebas serológicas positivas, algunos autores se niegan a aceptar la existencia de la forma crónica de la brucelosis.

## **HISTORIA DE LA BRUCELOSIS**

Las primeras informaciones recogidas sobre la brucelosis humana datan de principios del siglo XIX cuando habitantes de la isla mediterránea de Malta, incluidos soldados de las tropas británicas destinados, morían de un cuadro febril de causa desconocida.

Fue un médico de la armada británica, Jeffery Allen Marston, quien pudo haber realizado la primera descripción de la brucelosis crónica cuando en 1861 describió, basándose en su propia afección, que el paciente era propenso a recaer y a permanecer convaleciente con reumatismos durante mucho tiempo (Marston, 1861).

En 1887, David Bruce, médico de la base naval de la isla de Malta, aisló el agente etiológico a partir del bazo de soldados fallecidos de brucelosis y lo nombró *Micrococcus melitensis* (Bruce, 1887). Diez años más tarde, Mathew Louis Hughes, también miembro del servicio médico de dicha base, hizo una descripción clínica definitiva de la enfermedad a la que denominó Fiebre Ondulante. En su famosa monografía relata muchos casos de ciática que se prolongan en el tiempo durante 12 o

24 meses e incluso más años y comenta que esta enfermedad ya había sido descrita en el siglo V por Hipócrates (Hughes, 1897).

Recientemente, Capasso ha descrito lesiones típicas de brucelosis en restos óseos pertenecientes a adultos que quedaron carbonizados tras la erupción volcánica del monte Vesubio en la ciudad romana de Herculaneum en el año 49 a.C. (Capasso, 2002).

En 1903, Bassett-Smith, defendió que el microorganismo puede permanecer latente en el bazo de los pacientes durante largos periodos de tiempo, liberándose a la circulación de forma intermitente, causando una exacerbación de la fiebre y reduciendo la actividad fagocítica y el número de leucocitos en muchos casos (Bassett-Smith, 1903). Dos años más tarde, se constituyó la Comisión de la Fiebre Mediterránea, para la que trabajaba Temistocles Zammit. Este investigador fue encargado de inducir experimentalmente la enfermedad en cabras pero descubrió que muchas de ellas ya daban previamente positiva la prueba de seroaglutinación para *Micrococcus*, prueba que había sido desarrollada por Almroth Wright en 1897. Ese mismo año, el veterinario danés Bernard Laurits Frederick Bang identificó el microorganismo causante del aborto bovino al que denominó *Bacillus abortus* (Bang, 1897). El posterior aislamiento del microorganismo a partir de leche de cabra realizado por Horrocks, demostró la naturaleza zoonótica de la enfermedad (Horrocks, 1905). En 1911, Jacob Traum aisló por primera vez *Brucella suis* de un cerdo (Mohler, 1913). Seis años más tarde, la microbióloga Alice Evans encontró gran similitud entre *Bacillus abortus*, descrito por Bang, y *Micrococcus melitensis*, responsable de la Fiebre Mediterránea, y sugirió el término “brucelosis” para esta enfermedad (Evans, 1918). En 1920, Meyer y Shaw agruparon estos dos microorganismos y los llamaron *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* en honor a D. Bruce (Meyer, 1920). En 1924, Orpen, del laboratorio de Salud Pública de Salisbury, aisló por primera vez *B. abortus* de la sangre de un paciente. En 1925, A. Evans hizo una primera descripción global de la enfermedad, incluyendo también la infección debida a *B. suis*. Fue A. Evans, que sufrió las consecuencias de la enfermedad, quien sugirió por primera vez su cronicidad.

Los miembros del género permanecieron estables hasta el año 1956 cuando Buddle describió *Brucella ovis*, responsable de la epididimitis del carnero y de un tipo

especial de aborto epizootico de la oveja (Buddle, 1956). Al año siguiente, Stoenner y Lackman describieron *Brucella neotomae* aislada en roedores y ratas del desierto (Stoenner y Lackman, 1957). Posteriormente, Carmichael y Kenney, describieron *Brucella canis* (Carmichael y Kenney, 1968). A estas seis especies, reconocidas como las especies clásicas se han añadido recientemente nuevas especies aisladas a partir de animales marinos, las cuales serán citadas más adelante.

## EPIDEMIOLOGÍA

### Vías de transmisión

De forma natural, *Brucella* spp. infecta a un gran número de animales domésticos y salvajes (Godfroid, 2002), con cierto tropismo de especie.

La infección se transmite al humano principalmente a través de la piel o mucosas por contacto directo con tejidos como la placenta, o secreciones como la orina, heces o leche del animal infectado o por consumo de productos lácteos sin pasteurizar. También puede transmitirse por vía respiratoria mediante inhalación de aerosoles contaminados. Se ha descrito que entre 10 y 100 brucelas inhaladas en un aerosol pueden causar infección (Al-Dahouk *et al.*, 2003(a)). En la actualidad, la población principal de riesgo son los trabajadores en contacto con ganado como pastores, ganaderos, veterinarios, trabajadores de establos o mataderos, profesionales de la industria alimentaria y personal de laboratorio. No obstante, también se han descrito casos raros de contagio madre-hijo vía placenta, transplante de órganos, transmisión sexual o contacto con cosméticos derivados de productos animales contaminados (Al-Kharfy, 2001; Godfroid, 2002; Grave y Sturm, 1983; Mantur *et al.*, 1996; Naparstek *et al.*, 1982; Palanduz *et al.*, 2000; Pappas *et al.*, 2005; Ruben *et al.*, 1991; Stantic-Pavlinic *et al.*, 1983; Wyatt, 1996).

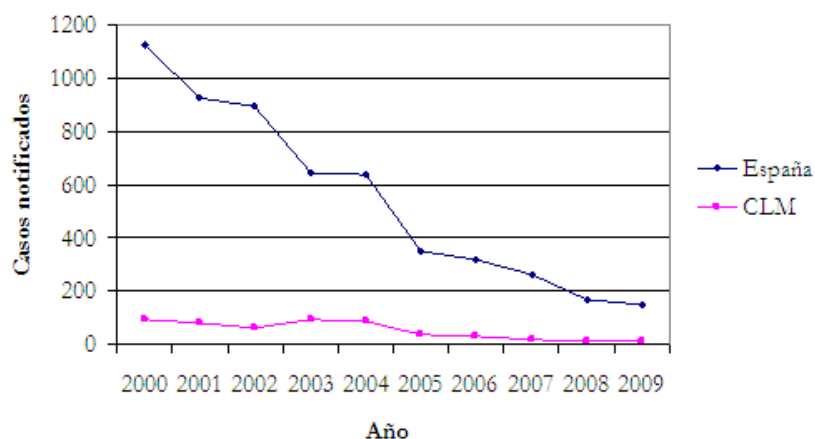
La enfermedad tiene una distribución estacional desde el mes de marzo hasta el comienzo del verano en relación con la biología de los óvidos. Se trata de una enfermedad profesional, ligada al medio rural de forma importante y con edades de máxima incidencia comprendidas entre los 20 y los 40 años, afectando preferentemente a los varones (Spink, 1954).

## **Distribución mundial**

La brucelosis es una enfermedad de distribución mundial que afecta principalmente a países de la cuenca mediterránea, Oriente Medio, India, América Central y América del Sur, con importantes repercusiones tanto para la salud pública como para la economía de los países en desarrollo (Pappas *et al.*, 2005). Los países con mayor número de casos registrados de brucelosis aguda humana son Siria, Turquía e Iraq (Solera y Castaño, 2008). La brucelosis está incluida en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) desde el año 1943 (WHO, 1986). Es una de las enfermedades incorporadas en el Programa de Vigilancia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el control de las Infecciones e Intoxicaciones de origen alimentario en Europa, del cual España forma parte desde 1983. En 2005, un estudio realizado en Grecia reveló que el 6,1% de la leche de vaca examinada presentaba *Brucella* spp. (European Food Safety Authority, 2006).

En los últimos años, en España, se ha reducido de forma notable el número de casos registrados gracias a los programas de vacunación de ganado, de sacrificio de animales enfermos y de control sanitario de productos de origen animal (Figura 1). A pesar de los esfuerzos realizados, en nuestro país sigue siendo una enfermedad endémica, de predominio rural, con una tasa de incidencia más alta que la de los países de nuestro entorno. El centro de la península sigue siendo la zona con mayor número de casos. Por Comunidades Autónomas, Extremadura es la que presenta una tasa más elevada (2,41 por 100.000 habitantes), seguida por Aragón (0,86), Andalucía (0,71), Castilla y León (0,69), y Castilla-La Mancha (0,61) (Anónimo 1, 2009).

La tendencia general favorable en la mayoría de regiones españolas puede no reflejar la existencia de áreas locales endémicas donde la brucelosis continúa siendo un problema no resuelto, ya que las zonas de baja incidencia pueden enmascarar las cifras de áreas rurales escasamente pobladas (Serra *et al.*, 2000). Según el informe de la OMS, la proporción de casos de brucelosis crónica generalmente no supera el 5%, porcentaje que podría elevarse si no fuera por la dificultad de su diagnóstico (WHO, 1986).



**Figura 1. Casos declarados de brucelosis humana en España y Castilla-La Mancha durante el periodo 2000-2009.** Datos obtenidos del Registro de Declaración Obligatoria del Boletín Epidemiológico Nacional.

## GÉNERO *BRUCELLA* SPP.

### Características generales

Las especies del género *Brucella* spp. son cocos o cocobacilos intracelulares facultativos, Gram negativos con un tamaño entre 0,5 y 0,7  $\mu\text{m}$  de longitud y entre 0,6 y 1,5  $\mu\text{m}$  de ancho, aerobios e inmóviles. Son catalasa y oxidasa positivos, a excepción de las especies *B. neotomae* y *B. ovis* que son oxidasa negativas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37° C a pH entre 6,6 y 7,4. *Brucella* spp. requiere biotina, tiamina y nicotinamida en su medio de cultivo. Su crecimiento en cultivo se favorece por adición de sangre o suero y es inhibido por sales biliares, telurito o selenito. En medios sólidos adecuados se observan colonias bien delimitadas, ligeramente convexas, con un tamaño entre 1 y 3 mm de diámetro, bordes lisos, translúcidas y de color miel pálido.

La identificación de *Brucella* spp. a nivel de género se realiza mediante el estudio morfológico de las colonias, el examen al microscopio con tinción previa de Gram, la prueba de aglutinación con un suero anti-*Brucella* y, en caso de disponer de ellos, con los sueros monoespecíficos anti-*Brucella melitensis* y anti-*Brucella abortus*. La identificación de especie y biovariedad requiere pruebas bioquímicas, de sensibilidad a colorantes y de sensibilidad a bacteriófagos (Alton *et al.*, 1975), la mayoría de las cuales sólo se pueden realizar en centros especializados de referencia regional o nacional.

La identificación de algunas cepas de *Brucella* spp. es difícil debido a la inestabilidad de algunas características fenotípicas de la bacteria. (Meyer, 1976). En cultivo, en especial en medios líquidos, y a lo largo de resiembras sucesivas, las especies de *Brucella* spp., sobre todo *B. melitensis*, manifiestan una tendencia marcada a la disociación lisa-rugosa. El aspecto diferente de estas colonias reside en el tipo de lipopolisacárido (LPS) expresado en su superficie. Por lo general, este fenómeno va acompañado de cambios en su virulencia o en sus características antigénicas. Las cepas en fase lisa son más virulentas que en fase rugosa. (Ariza J, 1996). Las colonias rugosas son menos transparentes, los bordes son irregulares y el color cambia desde un blanco mate a marrón. Es importante poder diferenciar las colonias lisas de las rugosas e intermedias, ya que para la preparación de vacunas y de antígenos para las pruebas serológicas y la identificación de las cepas recién aisladas es necesario partir de brucelas en fase lisa.

Este hecho, sumado a que son técnicas que requieren mucho tiempo, caras, difíciles de estandarizar y requieren personal entrenado, ha estimulado a diversos autores a desarrollar métodos moleculares para encontrar polimorfismos de ADN que permitan la tipificación molecular de las especies y biovariedades de *Brucella* spp. (Al-Dahouk *et al.*, 2004; Bricker y Halling, 1994; Cloeckert *et al.*, 1996; Fekete *et al.*, 1992; Ferrao-Beck *et al.*, 2006; Ficht *et al.*, 1996; García-Yoldi *et al.*, 2006; Le Fleche *et al.*, 2006; Mercier *et al.*, 1996; Whatmore *et al.*, 2005; Whatmore *et al.*, 2006; Whatmore *et al.*, 2007).

## **Genoma**

El tamaño medio del genoma de *Brucella* spp. es de  $2,6 \times 10^9$  daltons con un contenido en pares GC del 57,9-59,2% (De Ley *et al.*, 1987). A excepción de la biovariedad 3 de *B. suis* que presenta sólo un cromosoma de 3,1 Mb (Jumas-Bilak *et al.*, 1998a; Michaux *et al.*, 1993), el genoma de *Brucella* spp. está organizado en dos cromosomas circulares, uno grande de aproximadamente 2,1 Mb y otro pequeño de aproximadamente 1,1 Mb. *Brucella* spp. no tiene plásmidos u otros elementos genéticos móviles, sin embargo, se ha descrito que es capaz de mantener y transferir plásmidos exógenos (Rigby y Frase, 1989). Según Rigby y Frase, esta ausencia refleja, muy



probablemente, la adaptación a un nicho ecológico estable como es el ambiente intracelular, sin competencia microbiana, en el que no es necesaria la plasticidad genética que se deriva de los plásmidos y que es propia de ambientes como el intestino donde hay una gran carga microbiana. Además, la ausencia de plásmidos hace difícil la adquisición y transmisión de resistencias frente a los antibióticos, lo que podría explicar la ausencia de cepas de *Brucella* spp. resistentes a los antibióticos que habitualmente se emplean en el tratamiento de la brucelosis humana. Por otro lado, la presencia de dos cromosomas posiblemente refleje el origen evolutivo de *Brucella* spp., ya que otras bacterias próximas poseen megaplásmidos que, por adquisición de genes esenciales, generarían cromosomas auténticos.

Recientemente se ha secuenciado el genoma completo de *B. melitensis* (Del Vecchio *et al.*, 2002), de *B. suis* (Paulsen *et al.*, 2002), de dos cepas de *B. abortus* (Chain *et al.*, 2005; Halling *et al.*, 2005) y de una cepa de *B. abortus* atenuada espontáneamente, *B. abortus* 19 o S19 (Crasta *et al.*, 2008). Así por ejemplo, el genoma de *B. melitensis* contiene dos cromosomas o replicones circulares independientes, el cromosoma I de 1,2 Mb con un contenido en pares GC de 57,2% y el cromosoma II con 2,1 Mb y un contenido en pares GC de 57,3% (<http://patric.vbi.vt.edu>). Los dos cromosomas difieren en que el origen de replicación del cromosoma I es típico de los cromosomas bacterianos donde se encuentra la mayoría de los genes esenciales, mientras que el cromosoma II es de tipo plasmídico. De los 3197 marcos de lectura abiertos, 2487 tienen una función conocida (DelVecchio *et al.*, 2002).

De entre todos los genes de *Brucella* spp., los que codifican para proteínas de la membrana externa son los que exhiben mayor polimorfismo (Cloeckaert *et al.*, 1995; Cloeckaert *et al.*, 1996; Cloeckaert *et al.*, 2001; Cloeckaert *et al.*, 2002; Ficht *et al.*, 1990; Ficht *et al.*, 1996; García-Yoldi *et al.*, 2005; Sangari *et al.*, 1994; Vizcaíno *et al.*, 2000).

Los ensayos de polimorfismo de ADN han servido como base para la creación de pruebas de detección múltiple de ADN de las especies de *Brucella* spp. en muestras clínicas, como veremos en el apartado del diagnóstico molecular. En concreto, la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, de la terminología inglesa

*Single Nucleotide Polymorphism*) ha permitido el desarrollo reciente del primer ensayo de PCR en tiempo real (PCRtr) múltiple con potencial diagnóstico clínico de todas las especies de *Brucella* spp., incluidas las especies marinas (Gopaul *et al.*, 2008).

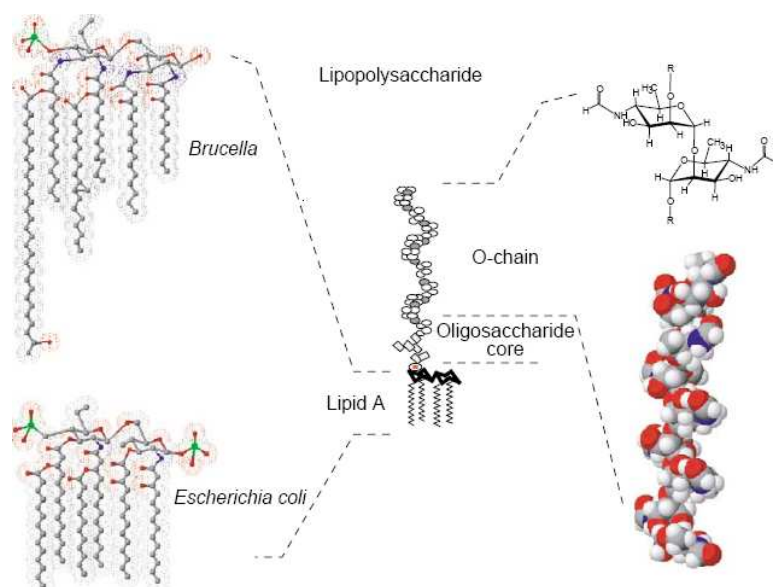
El elemento de inserción IS711 de *Brucella* spp., descubierto por primera vez en *B. ovis* (Halling *et al.*, 1993), se ha utilizado como diana para identificar especies y biovariedades de este microorganismo (Bricker *et al.*, 1994; Cloeckaert *et al.*, 2000). Tiene una longitud de 842 pb y un contenido en pares GC similar al del genoma de *Brucella* spp. (Halling *et al.*, 1993). El genoma de otros géneros de la clase Proteobacteria en la que se incluye *Brucella* spp. no contiene elementos de inserción relacionados con IS711 por lo que parece que es un elemento nativo de esta bacteria. El número de copias de este elemento es diferente según la especie. Así, *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* contienen siete copias. Sin embargo, *B. ovis* contiene cerca de 35 copias (Halling *et al.*, 1993, Ouahrani *et al.*, 1993) y las especies marinas de *Brucella* spp. más de 20 copias (Clavareau *et al.*, 1998). Recientemente se ha publicado un estudio en el que se describe por primera vez la transposición de IS711 en una cepa de *B. ovis* y una cepa de *B. pinnipedialis*, aunque con baja actividad (OCampo-Sosa y García-Lobo, 2008).

### **Envoltura celular**

La estructura más característica de las bacterias Gram negativas es su envoltura celular, compuesta por una membrana citoplásmica, una membrana externa y un espacio periplásmico intermedio. La membrana externa contiene, distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y un LPS.

Como en otras bacterias Gram negativas, el LPS de *Brucella* spp. está formado por una región hidrofóbica insertada en la membrana externa llamada lípido A y una región hidrofílica dirigida hacia el exterior (Figura 2). Ésta última se divide en dos secciones: el núcleo oligosacárido interno y una cadena-O externa, hacia la que están dirigidos la mayoría de los anticuerpos en la respuesta humoral. Las especies de *Brucella* spp. que característicamente poseen esta cadena-O son llamadas especies lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*), aunque pueden perderla accidentalmente por mutación denominándose mutantes rugosos o R. La cadena-O está

ausente o reducida a unos cuantos residuos en las especies rugosas de *Brucella* spp. (*B. ovis* y *B. canis*) (Corbel y Redwood, 1984). Esta diferencia es importante, ya que las brucelas habitualmente patógenas para el hombre poseen LPS en fase lisa y éste es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica (Moreno y Moriyón, 2002).



Lapaque et al., 2005.

**Figura 2. Estructura del LPS de *Brucella* spp.** El lípido A de *B. abortus* difiere del LPS de *E. coli* en que posee un esqueleto de diaminoglucosa, en lugar de glucosamina, unido por enlaces amida (en lugar de amida y éster) a ácidos grasos de cadena más larga (C18-C19 y C-28 en lugar de C12 y C14). El núcleo oligosacárido está compuesto por ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico (Kdo), manosa y glucosamina y no contiene ni heptosas ni fosfatos. La quinovosamina está presente en el núcleo del LPS liso pero no en el LPS rugoso. La cadena-O oligosacáridica es un homopolímero de N-formil-perosamina.

Se ha descrito que la membrana externa de *Brucella* spp. difiere de la de los patógenos Gram negativos típicos (enterobacterias y pseudomonas). En primer lugar, es relativamente permeable a agentes hidrofóbicos como los colorantes, detergentes y sales biliares. En segundo lugar, es resistente a componentes bactericidas como la polimixina B y a péptidos catiónicos bactericidas como lisozima, lactoferrina o defensina, entre otros, presentes en lisosomas y fluidos corporales. Estas características se relacionan con ciertas propiedades de los componentes de la membrana externa. Por un lado, los lípidos de ornitina, podrían proteger la carga negativa del ácido 3-deoxi-D-octulosónico (Kdo) del núcleo y el lípido A del LPS, principales dianas de los agentes policatiónicos

(Lapaque *et al.*, 2005). Por otro, la envoltura de *Brucella* spp. es rica en fosfatidilcolina y contiene lípidos de ornitina, lo que es poco común en patógenos Gram negativos, cuyo fosfolípido principal es la etanolamina.

Las proteínas de la membrana externa (*Omp*, de la terminología inglesa *Outer membrane protein*) se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1 (89-94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa). Dentro del grupo 3 se encuentra la proteína *Omp25* que ha sido utilizada como diana en diversos ensayos para el diagnóstico molecular de la enfermedad.

La unión de la capa de peptidoglicano a la membrana externa es más estrecha en *Brucella* spp. que en otras bacterias Gram negativas. Este hecho, junto con la elevada hidrofobicidad de la membrana externa condiciona probablemente el que para su extracción con detergentes sean necesarias condiciones más severas que en otras bacterias (Moriyón y López-Goñi, 1998).

## **TAXONOMÍA**

La taxonomía de *Brucella* spp. todavía está por establecer. El análisis de las secuencias del ácido ribonucleico 16S (ARNr 16S) ha permitido ubicar a *Brucella* spp. dentro del grupo alfa del subgrupo 2 de la clase Proteobacteria junto con bacterias simbiotes y patógenas de plantas de la familia *Rhizobiaceae*, como *Rhizobacterium* spp. y *Agrobacterium* spp. y parásitos de vida intracelular como *Bartonella* spp. y *Rickettsia* spp. (Moreno *et al.*, 1990) y con bacterias de vida libre patógenas oportunistas del hombre como *Ochrobactrum intermedium*, con la que comparte el 98,8% en homología del ARNr 16S (Moreno *et al.*, 1990; Scholz *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 1998).

La clasificación tradicional reconocía seis especies de *Brucella* spp. subdivididas en 15 biovariedades que se distinguen entre sí según características fenotípicas, patogénicas y de afinidad por el hospedador. Esta clasificación incluía a *B. melitensis*, biovariedades 1, 2 y 3 con afinidad por el ganado ovino y caprino; *B. abortus*, biovariedades 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 con afinidad por bóvidos; *B. suis*, biovariedades 1, 2, 3, 4 y 5 con afinidad por el ganado porcino las tres primeras, por renos la biovariedad 4 y

por pequeños roedores la biovariedad 5; *B. canis* con afinidad por cánidos; *B. ovis* por óvidos y *B. neotomae* por ratas del desierto (Alton *et al.*, 1975; Corbel, 1997).

La controversia surge cuando Verger y cols., a partir de la base de que todas las especies de *Brucella* spp. comparten más del 90% de homología en el ácido desoxirribonucleico (ADN), proponen considerar *B. melitensis* como una única especie y todas las demás especies como biovariedades de ésta (Hoyer y McCullough, 1968; Verger *et al.*, 1987; Verger *et al.*, 2000). Así, el Subcomité de Taxonomía de *Brucella* spp. aceptó en 1986 la clasificación propuesta por Verger, sin embargo, la mayoría de los investigadores prefirieron la denominación clásica a efectos prácticos por lo que el Subcomité volvió a la nomenclatura anterior en el año 2006 ([www.the-icsp.org](http://www.the-icsp.org)).

De un lado están los estudios que apoyan la conservación genética propuesta por Verger, como los descritos por Gandara, Halling o Whatmore (Gandara *et al.*, 2001; Halling *et al.*, 2005; Whatmore *et al.*, 2005), o la demostración realizada por Gee y cols. de la existencia de una homología en la secuencia del ARNr 16S de más del 77% en todas las especies de *Brucella* spp. (Gee *et al.*, 2004). De esta parte están también los estudios que defienden que la estructura y organización genómica de una especie dada, o incluso su biovariedad, tiene características únicas y distintivas que hacen posible que el género conste de linajes clonales, cada uno adaptado de forma específica aunque no exclusiva, a un hospedador (Gee *et al.*, 2004; Jumas-Bilak *et al.*, 1998b). En la oposición, están los autores que, sirviéndose del gran polimorfismo que exhiben algunos genes de *Brucella* spp., presentan métodos que permiten la diferenciación de muchas de las especies, si no de todas (Le Fleche *et al.*, 2006; López-Goñi *et al.*, 2008; Whatmore *et al.*, 2006).

En 1994 se aislaron por primera vez dos cepas de *Brucella* spp. en muestras de delfines que inicialmente se denominaron *Brucella maris* (Ewalt *et al.*, 1994). En los años siguientes se aislaron numerosas cepas de *Brucella* spp. a partir de otros animales marinos como focas, marsopas o ballenas (Bricker *et al.*, 2000; Cloeckaert *et al.*, 2000; Cloeckaert *et al.*, 2001; Cloeckaert *et al.*, 2003; Verger *et al.*, 2000). Se encontró que estas especies marinas de *Brucella* spp. diferían de las especies terrestres tanto a nivel fenotípico como molecular por lo que se propusieron dos nombres, *Brucella cetaceae*

para aquellas aisladas a partir de marsopas, delfines y ballenas y *Brucella pinnipediae* para las aisladas a partir de focas (Cloeckaert *et al.*, 2001). Desde principios de 2008, el Subcomité de Taxonomía de *Brucella* spp. ha incluido estas dos especies bajo la denominación de *Brucella ceti* y *Brucella pinnipedialis* (Foster *et al.*, 2007) y dos nuevas especies, *Brucella microti*, aislada en el topillo campestre, en el zorro rojo y en muestras de tierra (Hubalek *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008) y *Brucella inopinata*, aislada a partir de un implante de mama infectado (Scholz *et al.*, 2010).

Es el avance en técnicas moleculares el que ha puesto en duda la posición de algunas de las especies dentro del género *Brucella* spp. Por ejemplo, algunos investigadores sostienen que la biovariedad 5 de *B. suis* está más relacionada con las especies que infectan animales marinos que con las biovariedades descritas para ella (Marianelli *et al.*, 2006; Whatmore *et al.*, 2006; Whatmore *et al.*, 2007). Lo mismo sucede con la biovariedad 3 de *B. abortus* para la que se ha encontrado dos subgrupos (OCampo-Sosa *et al.*, 2005) y se ha visto que está atípicamente relacionada con otras de su misma especie (Whatmore *et al.*, 2006).

## INMUNOLOGÍA Y PATOGÉNESIS

El mecanismo efector más relevante frente a una infección por *Brucella* spp. es la inmunidad mediada por células, principalmente macrófagos y linfocitos T. Ambos tipos de células son indispensables para el desarrollo de la inmunidad, pero también contribuyen en la patogénesis.

A diferencia de otras bacterias intracelulares, *Brucella* spp. carece de factores de patogenicidad clásicos como exotoxinas, enzimas citolíticas, cápsula, fimbrias, flagelos, plásmidos, fagos lisogénicos, formas resistentes o variación antigénica (Gorvel y Moreno, 2002). La patogenicidad de *Brucella* spp. está relacionada con su capacidad para adherirse, penetrar, sobrevivir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células fagocíticas tanto profesionales como no profesionales entre las que se incluyen monocitos, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales (Roop *et al.*, 2009). Esta ubicación intracelular la mantiene alejada de los antibióticos y de los componentes plasmáticos bactericidas como el complemento y los anticuerpos, lo que favorece el establecimiento de la enfermedad crónica (Boura *et al.*, 1984).

Tras el ingreso de *Brucella* spp. en el organismo, uno de los primeros eventos que ocurren es la activación del sistema del complemento. El LPS de *Brucella* spp. se caracteriza por ser un activador del complemento más débil que el de las enterobacterias, lo que estaría relacionado con la resistencia de la bacteria a los factores séricos. No está claro el papel del complemento en la resistencia frente a las infecciones producidas por *Brucella* spp. Se ha demostrado que la vía alternativa del complemento es incapaz de eliminar la cepa virulenta de *B. abortus* 2308 (Eisenschenk *et al.*, 1999), por lo que la lisis de la bacteria estaría mediada principalmente por la vía clásica, dependiente de anticuerpos (Fernández-Prada *et al.*, 2001).

El LPS de *Brucella* spp. es considerado un antígeno timo independiente, capaz de activar a los linfocitos B para la producción de inmunoglobulinas (Ig) aún en ausencia de células T (Golding *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar de los elevados títulos de anticuerpos alcanzados, la respuesta inmunitaria humoral es poco eficaz desde el punto de vista protector. Al igual que sucede en otras bacterias como *Yersinia enterocolítica* o *Salmonella* spp., la cadena-O del LPS liso de *Brucella* spp. impide la deposición de la subunidad C1q al complejo antígeno-anticuerpo, lo que favorece su supervivencia extracelular.

### **Mecanismos de penetración intracelular**

El mecanismo de penetración intracelular de *Brucella* spp. no está suficientemente aclarado. Por un lado, se presume que el LPS liso, mediante su unión a receptores de tipo manosa, y las proteínas de la membrana externa, mediante su unión a integrinas, participan en el mismo. Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa (Pontow *et al.*, 1992) y eritritol, lo que explica la avidez de la bacteria por los mismos (Aréstegui *et al.*, 2001). Se ha visto además que las brucelas opsonizadas son internalizadas y destruidas más eficientemente por macrófagos que las no opsonizadas (Young *et al.*, 1985) lo que sugiere que la penetración intracelular de la bacteria también involucra receptores Fc y complemento del suero. Por otro lado, parece que *Brucella* spp. penetra en los macrófagos a través de bolsas lipídicas (Watarai *et al.*, 2002).

El sistema de dos componentes BvrR/BvrS modula la expresión de *Omp* necesarias para el reclutamiento de GTPasas pequeñas, implicadas en la polimerización de actina y en la penetración de la bacteria. Se ha visto que mutantes defectivos en este sistema alteran la producción de *Omp22* y *Omp25*, lo que hace que disminuya la característica resistencia de la membrana externa de *Brucella* spp. a policonaciones bactericidas, incrementando su permeabilidad a detergentes (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; López-Goñi *et al.*, 2002; Sola-Landa *et al.*, 1998).

Otro factor implicado en la adhesión de *Brucella* spp. a células epiteliales, macrófagos y eritrocitos, tanto de animales como de humanos, es el ácido siálico (Castañeda-Roldán *et al.*, 2004), lo cual indica la presencia de una lectina en la bacteria que reconoce receptores de la célula huésped.

Castañeda-Roldán y cols. han encontrado en la presencia de anticuerpos frente a una proteína superficial de membrana, la SP41, un biomarcador de infección. Estos investigadores observaron anticuerpos en el 70% de los pacientes con brucelosis aguda frente al 10% de los pacientes con brucelosis crónica, lo cual sugiere que esta proteína es producida *in vivo* y que puede jugar un papel durante la infección (Castañeda-Roldán *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha identificado el gen BMEI026 flanqueado por el gen *invA* y un gen que codifica una proteína hipotética crucial para la internalización de *B. melitensis* en células HeLa cuya función se desconoce. El gen *invA* comparte un 54% en hibridación con el gen *ialA* de *Bartonella bacilliformis* que junto con el gen *ialB* son indispensables para invadir los eritrocitos humanos (Hernández-Castro *et al.*, 2008).

### **Mecanismos de supervivencia intracelular**

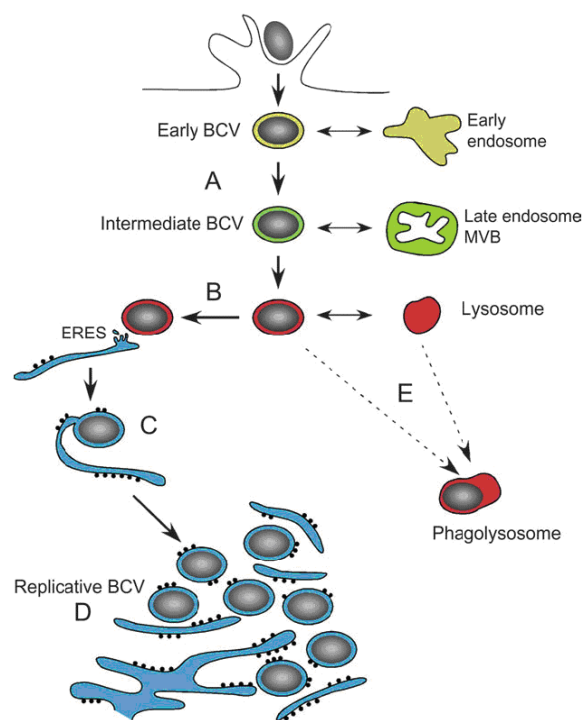
Las células fagocíticas, especialmente los macrófagos, son la primera línea de defensa frente a *Brucella* spp. La principal función de estas células es la producción de enzimas proteolíticas y otros metabolitos con efecto microbicida a través de dos mecanismos principales: la fusión fagosoma-lisosoma y la generación de intermediarios reactivos de oxígeno (*ROIs*) por medio de la explosión oxidativa. Además del efecto bactericida de los *ROIs*, la explosión oxidativa activa otros sistemas como la enzima



mieloperoxidasa (MPO) y el óxido nítrico (NO). La MPO en presencia de un halógeno como el cloro cataliza la reacción de éste con el peróxido de hidrógeno generando ácido hipocloruro, con acción microbicida. También juega un papel importante el hierro presente en los macrófagos que cataliza una reacción metabólica destinada a incrementar la producción de los *ROIs* (Jiang y cols., 1993).

En la supervivencia intracelular de *Brucella* spp., parece que intervienen la guanosina 5'-monofosfato (GMP) y la adenina, bloqueando la degranulación, la fusión fagosoma-lisosoma y la activación del sistema MPO (Canning *et al.*, 1986). Otra característica importante de la interacción de *Brucella* spp. con los macrófagos es la capacidad de inhibir la apoptosis en las células infectadas (Groos *et al.*, 2000).

Además se ha descrito que un 15-30% de las brucelas internalizadas sobrevive en un compartimento de membrana llamado BCV (de la terminología inglesa *Brucella Containing Vacuole*), un fagosoma modificado que interacciona primero con los endosomas tempranos y después con los lisosomas (Figura 3) (Starr *et al.*, 2008). A este nivel interviene el glucano cíclico  $\beta$ 1-2 periplásmico que, con su habilidad para extraer colesterol de las membranas eucarióticas, disgrega las balsas lipídicas presentes en la membrana de las BCVs para evitar la fusión con el lisosoma (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Se ha visto que cepas lisas de *Brucella* spp. muertas por calor son más eficaces que los mutantes rugosos para evitar la fusión con el lisosoma, lo cual indica la importancia de la cadena-O del LPS en este proceso (Porte *et al.*, 2003). Sin embargo, el retraso de la fusión con el lisosoma dependiente del LPS liso es transitorio e insuficiente para asegurar la supervivencia de *Brucella* spp. a largo plazo, por lo que se ha sugerido que son necesarios otros factores que permitan completar el ciclo intracelular de la bacteria. La acidificación de la BCV es un estímulo importante en la expresión del sistema de secreción tipo IV *virB*. Este sistema bombea iones nitratos al interior del RE neutralizando el pH de su interior y permitiendo la respiración anaeróbica de las brucelas (Celli, 2006).



*Starr et al., 2008.*

**Figura 3. Tráfico intracelular de *Brucella* spp.**

### **Anergia en los pacientes con brucelosis crónica**

La segunda función de los macrófagos infectados por *Brucella* spp. consiste en producir y liberar citoquinas, que tienen efectos inmunorreguladores y median las manifestaciones clínicas de la infección. La interleuquina 1 (IL-1) es un pirógeno endógeno que contribuye a la característica fiebre de la infección. La IL-6 activa a los linfocitos B para la producción de inmunoglobulinas. La IL-12 estimula a las células NK y a los linfocitos T colaboradores CD4+ y CD8+ que secretan interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Zhang *et al.*, 1995). El IFN- $\gamma$  a su vez actúa sobre los macrófagos que incrementan la explosión oxidativa y la producción de NO en su acción bactericida frente a *Brucella* spp. A pesar de ello, y como se ha visto en modelos *in vitro* de macrófagos infectados por *Brucella* spp., la respuesta mediada por células T no consigue la completa eliminación de las brucelas intracelulares (Caron *et al.*, 1994; Rittig *et al.*, 2001). Otra de las citoquinas esenciales para iniciar la actividad frente a *Brucella* spp. por parte de los macrófagos es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), citoquina que no producen los macrófagos infectados con *B. suis* (revisado en Dornand

*et al.*, 2002). Según Jubier-Maurin y cols. esta supresión se debe a la proteína de membrana *Omp25* de *Brucella* spp. Estos autores comprobaron además que dicha supresión no se daba en ratones (Jubier-Maurin *et al.*, 2001). El TNF- $\alpha$  sinergiza con el IFN- $\gamma$  para aumentar la producción de NO por el macrófago para la destrucción de la bacteria (Jiang *et al.*, 1993).

Así, una respuesta inmunitaria mediada por células T cooperadoras tipo Th1, con niveles elevados de IFN- $\gamma$ , se considera muy importante en el control de la brucelosis. Sin embargo, parece que este proceso se encuentra alterado en pacientes con brucelosis crónica. En 1977, Thornes estudió la respuesta a una prueba de hipersensibilidad retardada con 2,4-dinitroclorobenceno en una serie de pacientes con brucelosis crónica y encontró que presentaban niveles bajos de linfocitos T y sólo respondían a esta prueba cuando dichos niveles se normalizaban (Thornes, 1977). En 1996, Rodríguez-Zapata y cols. evaluaron los niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$  en pacientes con brucelosis aguda antes y después de recibir tratamiento antimicrobiano y vieron que, mientras los niveles de IL-2 eran normales, los niveles de IFN- $\gamma$  estaban disminuidos en pacientes no tratados (Rodríguez-Zapata *et al.*, 1996). Resultados similares se han descrito en otras infecciones causadas por bacterias intracelulares como la tuberculosis y la lepra (Kaplan *et al.*, 1985; Modlin *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1995). Recientemente, Skendros y cols. han visto que el nivel de células T CD4+/CD25+ en pacientes con brucelosis crónica es anormalmente bajo (Skendros *et al.*, 2007).

## **MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y ENFERMEDAD LOCALIZADA DE LA BRUCELOSIS HUMANA**

La brucelosis humana ha sido clasificada de forma arbitraria en varias categorías: aguda, subaguda, subclínica, recidivante y crónica (Gotuzzo *et al.*, 1982; Salata *et al.*, 1985; Solera *et al.*, 1997; WHO 1986). Sin embargo, dado el extraordinario polimorfismo clínico de la enfermedad no es posible asignar todas las formas de presentación a una u otra categoría.

La evolución de la enfermedad en el hombre depende de muchos factores que incluyen el estado del sistema inmunitario del hospedador, la presencia de otras

enfermedades concomitantes, la concentración de bacterias y la especie de *Brucella* spp. Así por ejemplo, *B. melitensis* tiende a originar un cuadro inicial agudo y agresivo; *B. suis* induce abscesos localizados y *B. abortus* se caracteriza por su menor invasividad, responsable de frecuentes formas asintomáticas y de fácil control terapéutico (Young *et al.*, 1979).

A continuación se describen las distintas categorías en que la brucelosis humana ha sido clasificada.

### **Brucelosis aguda**

El periodo de incubación de la enfermedad oscila entre una y tres semanas, aunque puede durar hasta dos meses (Young y Corbel, 1995). La enfermedad aguda puede presentarse de forma leve y transitoria, o grave con fiebre alta y síntomas constitucionales. Además de la fiebre, otros síntomas que refieren más del 50% de los pacientes son malestar general, escalofríos, sudación, astenia, anorexia, debilidad y artralgias. Algo menos frecuente es la pérdida de peso, cefalea, mialgias, dolor lumbar y tos no productiva. Síntomas más raros son disuria, dolor testicular, edema maleolar, náuseas, vómitos, dolor abdominal, alteración del hábito intestinal, movimiento involuntario de extremidades, parestesias, dolor ocular, visión borrosa, dificultad para dormir, nerviosismo o depresión (Ariza, 1996; Colmenero *et al.*, 1986; Lulu *et al.*, 1988; Mantur *et al.*, 2006; Mousa *et al.*, 1988). Generalmente, la exploración física es normal aunque puede aparecer hepatomegalia en un 40-60% de los pacientes, esplenomegalia en un 30-45% o linfadenopatías en un 15-25% (Ariza, 1996). Algo más del 5% de los pacientes presenta lesiones cutáneas, en forma de una erupción papulonodular no pruriginosa, predominantemente en el tronco y las extremidades. La presencia de una erupción similar al eritema nodoso es menos frecuente. Su estudio histológico revela una infiltración linfohistiocística granulomatosa de la dermis de la que en ocasiones se aísla el microorganismo (Ariza, 1996).

La analítica general suele mantenerse dentro de los límites normales aunque puede haber un aumento de los niveles séricos de enzimas hepáticas y de la bilirrubina. Las alteraciones hematológicas más comunes son la anemia y la leucopenia, con un 26% y un 11% respectivamente, seguidas de trombocitopenia en un 10%, y leucocitosis

en un 9% (Al-Eissa *et al.*, 1993; Crosby *et al.*, 1984; Franco *et al.*, 2007; Pappas *et al.*, 2005), tanto en las formas crónicas como en las agudas. Respecto a la velocidad de eritrosedimentación y la proteína C reactiva, por lo general, presentan valores normales y tienen poco valor diagnóstico (Agnew y Spink, 1949), pero en algunos casos pueden verse aumentadas (Buzgan *et al.*, 2007; Solera *et al.*, 1991). En cualquier caso, la alteración hematológica es leve y se resuelve con el tratamiento antimicrobiano (Crosby *et al.*, 1984).

### **Brucelosis subaguda**

La brucelosis subaguda es la forma descrita en áreas endémicas con un tiempo de evolución entre dos meses y doce meses (Spink, 1951; Buzgan *et al.*, 2010). El patrón clínico es más variado que el de la forma aguda, con un curso ondulante y subfebril. Los pacientes que no completan el tratamiento antimicrobiano son también incluidos en esta forma clínica de brucelosis. Los niveles de IgM son altos pero empiezan a aparecer niveles considerables de IgG.

### **Brucelosis subclínica o asintomática**

La brucelosis subclínica o con síntomas poco relevantes, se da con frecuencia en personas con factores de riesgo ocupacionales como veterinarios, pastores, trabajadores de mataderos o de la industria láctea (Henderson y Hill, 1972). Estos pacientes suelen presentar títulos elevados de anticuerpos sin evidencia de infección clínica, aunque también se ha detectado bacteremia asintomática por *Brucella* spp. (Celebi *et al.*, 2007). Estos pacientes generalmente necesitan observación pero no tratamiento antimicrobiano (Buchanan y cols., 1974).

### **Brucelosis recidivante**

Tras finalizar el tratamiento antimicrobiano, entre el 5 y 40% de los pacientes desarrollan una recaída de la enfermedad (Solera *et al.*, 1991). Las recidivas suelen ocurrir frecuentemente en los seis primeros meses que siguen al tratamiento aunque pueden aparecer hasta los 12 o 18 meses post-tratamiento (Solera *et al.*, 1995; Solera *et al.*, 1997). La clínica es similar a la del episodio agudo aunque los síntomas pueden ser

menos pronunciados y pueden asociarse a manifestaciones focalizadas de la enfermedad.

En individuos en continua exposición a *Brucella* spp., las recidivas son difíciles de distinguir de una reinfección (Buchanan *et al.*, 1974). Así, la recidiva debe confirmarse por el aislamiento de *Brucella* spp. a partir de muestras de sangre o tejidos del paciente con síntomas recurrentes.

Casi todos los casos de recidivas responden bien a un nuevo curso de tratamiento antimicrobiano (Solera *et al.*, 1995; Solera *et al.*, 1996). Los factores de riesgo asociados a presentar recidiva son la elección de un tratamiento inadecuado, la presencia de hemocultivos positivos en el episodio inicial, la duración de los síntomas de más de 10 días antes de la iniciación del tratamiento, fiebre de más de 38,3 °C, así como el sexo masculino y una cifra de plaquetas inferior a 150000/ml (Ariza, 1995; Solera *et al.*, 1998).

### **Enfermedad localizada**

Como sucede en otras infecciones causadas por patógenos intracelulares, los fagocitos transportan la bacteria a los nódulos linfáticos diseminando la infección. Si ésta prosigue, *Brucella* spp. llega a la sangre originando bacteriemia pudiendo alcanzar cualquier tejido u órgano donde puede persistir en el tiempo, incluso después de la curación clínica (Young, 1995). Se ha descrito enfermedad focal en articulaciones, huesos y tejidos blandos, aparato genitourinario, sistema nervioso central y periférico, endocardio y sistema vascular, bazo, hígado, vesícula, peritoneo, colon, piel y ojos, entre otros. A menudo se dan varias localizaciones conjuntamente (Ariza, 1996; Park *et al.*, 2007). Este tipo de manifestaciones se presenta en un porcentaje variable, entre el 20% y el 40% de los casos (Colmenero *et al.*, 1996), siendo más frecuentes en aquellos enfermos en los que el diagnóstico y el tratamiento se retrasa (Solera *et al.*, 1997).

### ***Complicaciones osteoarticulares***

Entre un 10% y un 85% de los pacientes desarrollan complicaciones osteoarticulares, siendo las más frecuentes las producidas por *B. melitensis* (Colmenero *et al.*, 1991; Gotuzzo *et al.*, 1982; Solera *et al.*, 1999; Tekkok *et al.*, 1993).

La sacroileítis es la localización osteoarticular más prevalente (10-15%) y predomina en la población joven de ambos sexos (Ariza, 1996). Habitualmente, la sacroileitis es unilateral aunque en ocasiones puede ser bilateral o estar asociada a una espondilitis y se caracteriza por dolor de localización lumbosacra o glútea, que puede llegar a ser incapacitante.

La espondilitis es la complicación más grave desde el punto de vista clínico, la más difícil de tratar, y se ha descrito entre el 2% y el 53% de los pacientes (Solera *et al.*, 1999). Afecta sobre todo a pacientes mayores y raramente se encuentra entre pacientes con menos de 40 años. Suele existir dolor de tipo inflamatorio y puede implicar cualquier segmento vertebral, aunque la localización más frecuente es la región lumbosacra. El 20% de los casos de espondilitis se acompañan de abscesos epidurales y paravertebrales que le confieren un peor pronóstico y precisan en ocasiones tratamiento quirúrgico. El aplastamiento vertebral, los abscesos o formaciones granulomatosas intraraquídeas pueden ocasionar un cuadro de compresión medular que puede ser grave, sobre todo si afecta al segmento cervical (Colmenero *et al.*, 1992).

Aunque más del 65% de los pacientes refiere artralgias, sólo un 5% desarrolla artritis periférica de grandes o pequeñas articulaciones (Ariza, 1996). Las articulaciones más comúnmente afectadas son las sacroilíacas, hombros y esternoclaviculares en adultos y las rodillas y caderas en niños (Solera y cols., 1999). El análisis del líquido sinovial (LS) presenta en la mayoría de las ocasiones un predominio de linfocitos con recuentos que oscilan entre 200 y 17000 células/mm<sup>3</sup>. El cultivo del LS es a menudo negativo (Mousa *et al.*, 1987) aunque algunos autores han aislado el germen hasta en un 50% de los casos (Gotuzzo *et al.*, 1982).

Desde el punto de vista del diagnóstico por imagen, la resonancia magnética nuclear (RMN) se ha mostrado más eficaz que la radiografía convencional, la

gammagrafía y la tomografía axial computarizada (TAC) ya que no sólo detecta la afectación ósea, sino que visualiza con detalle la extensión paravertebral e intrarraquídea.

### ***Complicaciones neurológicas***

La afectación del sistema nervioso central ocurre entre el 2% y el 18% de los pacientes, siendo la meningitis la forma de presentación más común (Bouza *et al.*, 1987), no obstante, las formas crónicas de meningitis son raras (Young, 1983). La meningitis se caracteriza por un cuadro de fiebre, cefalea, rigidez de nuca, náuseas y vómitos (Mousa A, 1986). El examen del líquido cefalorraquídeo (LCR) revela pleocitosis linfocítica con niveles elevados de proteína y niveles normales o bajos de glucosa (Bouza *et al.*, 1987). En el proteinograma del LCR se ha demostrado un aumento considerable de las gammaglobulinas (Pascual *et al.*, 1988). El diagnóstico se realiza por aislamiento de *Brucella* spp. en el LCR (Bucher *et al.*, 1990). Sin embargo, el cultivo del LCR con frecuencia es negativo, por lo que el diagnóstico se suele hacer por los métodos serológicos clásicos.

Las complicaciones neurológicas pueden presentarse también como mielitis, neuritis, trombosis venosa cerebral, abscesos cerebrales, alteraciones sensoriales y motoras, desórdenes en el habla y defectos visuales, epilepsia, hemorragia subaracnoidea, síndromes de desmielización o alteraciones psiquiátricas tales como depresión, amnesia, psicosis o desarreglos de la personalidad. Algunos de estos síntomas pueden confundirse con otros síndromes como el Parkinson (Giannelli, 1959) y el síndrome de Guillain-Barré (Bashir *et al.*, 1985).

### ***Complicaciones genitourinarias***

Las complicaciones genitourinarias pueden presentarse como prostatitis, epididimoorquitis, cistitis, nefritis intersticial, glomerulonefritis, salpingitis, abortos espontáneos, partos prematuros e infección intrauterina con muerte fetal (Solera *et al.*, 1997). La manifestación más frecuente en hombres jóvenes es la epididimoorquitis unilateral, con una incidencia entre el 2% y el 20% (Navarro-Martínez *et al.*, 2001). La



afección de otros tramos del sistema excretor es más rara, destacando la prostatitis en un 1% (Ariza, 1996).

### ***Complicaciones cardiovasculares***

Las complicaciones cardiovasculares incluyen endocarditis, miocarditis, pericarditis, endarteritis o tromboflebitis. Aunque la endocarditis ocurre en menos del 5% de los casos, es la causa principal de muerte por una complicación de la enfermedad (Solera *et al.*, 1997). La afectación de la válvula aórtica es el subtipo de endocarditis más frecuente con formación de microabscesos, fenómenos de embolia y destrucción progresiva de la misma (Reguera *et al.*, 2003). Los aneurismas de la aorta y los vasos grandes son infrecuentes (Solera *et al.*, 1997).

### ***Complicaciones hepatoesplénicas***

La incidencia de complicaciones hepáticas o esplénicas es muy baja, no más del 2-3% de los pacientes desarrollan este tipo de complicación (Colmenero *et al.*, 2002a). Los granulomas hepáticos son las formas más graves. Pueden deberse tanto a *B. melitensis* como a *B. abortus* (Cervantes *et al.*, 1982), requieren drenaje percutáneo y administración de antibióticos prolongado. Se puede aconsejar drenaje de las lesiones y esplenectomía si el antimicrobiano no es efectivo (Solera *et al.*, 1997). Otras formas de presentación son las calcificaciones hepáticas, cirrosis o colecistitis aguda (Solera *et al.*, 1997).

### ***Complicaciones respiratorias***

Los síndromes respiratorios se describen en el 15-25% de los pacientes (Pappas *et al.*, 2003). Menos del 40% de estos pacientes muestran radiografías del tórax normales (Pappas *et al.*, 2003; Solera *et al.*, 1997). Los infiltrados pulmonares son las formas más habituales y en ocasiones aparece derrame pleural aunque también puede aparecer neumonía o bronconeumonía (Solera *et al.*, 1997). La mayoría de las veces no es posible certificar la especificidad de las lesiones, ya que el aislamiento de *Brucella* spp. en el esputo resulta muy difícil (Ariza, 1996).

### ***Complicaciones cutáneas***

La afección cutánea por *Brucella* spp. es infrecuente. Se ha descrito en el 6% de una serie prospectiva de 436 pacientes con brucelosis aguda (Ariza *et al.*, 1989). Las manifestaciones incluyen exantema, nódulos, vesículas, lesiones psoriasiformes, placas de hiperpigmentación, eritema nudoso, lesiones purpúricas o petequiales, úlceras y vasculitis granulomatosa (Ariza *et al.*, 1989; Berger *et al.*, 1981).

### ***Otras complicaciones***

Otras complicaciones menos frecuentes son las hematológicas como anemia, leucopenia, trombocitopenia o pancitopenia (Solera *et al.*, 1997). Los abscesos de tejidos blandos son extremadamente raros aunque se han descrito casos de abscesos en glúteos, mama o glándula de Bartolino (Peled *et al.*, 2004). Las complicaciones oftalmológicas incluyen uveitis, queratitis, endoftalmias, dacriocistitis y neuritis óptica (Rolando *et al.*, 2009).

### **Brucelosis crónica**

El curso crónico de la enfermedad fue inicialmente explorado durante la década de los años 30 por la bacterióloga A. Evans, quien comparó la tendencia a la cronificación de varias especies animales con los problemas de salud que aquejaban a muchas personas después de contraer la enfermedad (Evans, 1961). Sin embargo, la teoría era intrínsecamente difícil de justificar y quedó como una anécdota clínica y propia de la generalización de los modelos animales.

En 1951, Spink y cols. publicaron un estudio sobre la evolución clínica de 65 pacientes diagnosticados de brucelosis que, en ausencia de un tratamiento antimicrobiano, se siguieron una media de cuatro años (Spink *et al.*, 1951). Del total de pacientes, el 15% se recuperó en los tres primeros meses, el 39% permaneció con síntomas entre los tres y doce primeros meses, hasta que presentaron una recidiva, y el 46% restante persistió con síntomas durante más de un año. De estos últimos 30 pacientes, 17 presentaron evidencia microbiológica de infección activa o signos claros de enfermedad focal; sin embargo, en 13 pacientes no pudo evidenciarse de manera

objetiva la persistencia de infección activa. Éstos últimos se quejaban de debilidad, fatiga, nerviosismo y depresión mental. Siete de ellos fueron diagnosticados de desórdenes psiquiátricos como neurastenia, psiconeurosis o ansiedad. De dos de ellos se postuló que el motivo de su dolencia era que estaban movidos por intereses de compensación económica, sin embargo, en los cinco restantes no se encontró justificación.

En un estudio posterior, los mismos autores publicaron una serie más amplia de 226 pacientes diagnosticados de brucelosis aguda (Spink *et al.*, 1951). Era el primer estudio en el que el seguimiento se prolongó después de haber finalizado el tratamiento antimicrobiano. Durante este periodo, que duró una media de dos años, los autores encontraron de nuevo un grupo de pacientes (19%) que persistía con síntomas durante más de un año, algunos hasta después de siete años y a pesar de haber recibido tratamiento antimicrobiano. Catorce de los 43 pacientes afectados (33%) presentaban signos propios de la enfermedad focal que desarrollaron y 29 quedaron con síntomas inespecíficos. Estos autores anotaron que con cierta regularidad estos pacientes se quejaban de debilidad, fatiga, nerviosismo y depresión mental, a pesar de que los cultivos eran negativos y los títulos de anticuerpos aglutinantes habían descendido. Propusieron la clasificación de los pacientes en dos grupos: pacientes con enfermedad focal y pacientes que, sin signos de focalidad, persistían con síntomas inespecíficos. Una vez más, nueve casos fueron diagnosticados de desórdenes psiquiátricos y alcoholismo. Esta descripción anecdótica sirvió para que durante muchos años algunos autores concluyeran que la brucelosis crónica era esencialmente un trastorno emocional (Cluff *et al.*, 1959; Imboden *et al.*, 1959).

En la actualidad, no hay consenso en la definición de brucelosis crónica, término utilizado a menudo en la literatura para describir estas situaciones clínicas. Algunos autores la definen como la persistencia de enfermedad focal o la aparición de nuevos brotes o recidivas, en general, tras un tratamiento inadecuado (Colmenero *et al.*, 1996). Otros, sin embargo, consideran la brucelosis crónica como aquella forma de presentación donde los síntomas de los pacientes persisten más de 6-12 meses antes de recibir un tratamiento antimicrobiano (Al-Attas *et al.*, 2005; Buzgan *et al.*, 2010; Nimri, 2003; Surucuoglu *et al.*, 2009) o en la que, tras un tratamiento antimicrobiano, los

pacientes permanecen asintomáticos pero con títulos serológicos elevados (Elfaki *et al.*, 2005). En el presente trabajo, consideramos pacientes con brucelosis crónica a aquellos que tras un episodio de brucelosis aguda, y después de recibir un tratamiento antimicrobiano adecuado, permanecen con síntomas durante más de un año, con o sin enfermedad localizada.

## **DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS HUMANA**

El gran polimorfismo clínico con que se presenta la brucelosis humana dificulta con frecuencia su diagnóstico. En áreas endémicas, la sintomatología es difícil de diferenciar de otras enfermedades febriles agudas y subagudas como la gripe, la malaria, los abscesos profundos o la tuberculosis (Solera, 2000). La presencia de un cuadro clínico compatible unido al antecedente epidemiológico de exposición a *Brucella* spp., permiten establecer un diagnóstico de presunción que debe confirmarse mediante pruebas de laboratorio.

Las pruebas de laboratorio más utilizadas son el aislamiento de *Brucella* spp. a partir de muestras clínicas y la detección de anticuerpos específicos en suero del paciente. Mientras que la brucelosis aguda es fácil de diagnosticar mediante estas pruebas, no ocurre lo mismo cuando se trata de pacientes de larga evolución. A continuación se detallan las pruebas de laboratorio más utilizadas, haciendo especial mención a las limitaciones que presentan en el diagnóstico de la brucelosis crónica. Finalmente, se resumen los ensayos moleculares recientemente introducidos para la detección de ADN de *Brucella* spp., incluido el ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (PCRQtr) empleado en este estudio, cuya utilidad en el diagnóstico de la brucelosis crónica es el principal objeto de estudio de esta tesis.

### **Diagnóstico bacteriológico**

El aislamiento e identificación de *Brucella* spp. en muestras clínicas supone la prueba irrefutable de enfermedad (Solera *et al.*, 1997). La elección de la muestra depende de la forma clínica y del periodo evolutivo de la enfermedad. *Brucella* spp. puede obtenerse por cultivo de sangre, médula ósea, líquido sinovial, LCR, líquido

pleural, líquido peritoneal, orina, líquido ascítico y pus o biopsias de varios tejidos como hígado, bazo o linfadenopatías (Etemadi *et al.*, 1984).

El hemocultivo, o cultivo microbiológico de la sangre, es el método de elección. La indicación clásica consiste en obtener hemocultivos ante la sospecha de bacteremia. Sin embargo, la presencia de *Brucella* spp. en sangre no siempre se acompaña de fiebre o escalofríos, por lo que la ausencia de estos síntomas no debe excluir la toma de la muestra. El índice de positividad de los hemocultivos depende de las prácticas realizadas en el laboratorio, de la fase evolutiva de la enfermedad y, en parte, de la especie de *Brucella* spp. responsable. Los hemocultivos son positivos en el 70-80% de los casos debidos a *B. melitensis*, y en un 50% de los causados a *B. abortus* (Spink, 1956).

El porcentaje de hemocultivos positivos para *B. melitensis* es del 70-80% en las formas agudas, cuando la bacteremia suele ser continua (Ariza *et al.*, 1995). Sin embargo, en las fases subagudas o crónicas, la bacteremia puede ser intermitente, lo cual justifica que los hemocultivos sean raramente positivos (Gotuzzo *et al.*, 1986).

*Brucella* spp. se caracteriza por ser una bacteria de crecimiento lento por lo que la visualización macroscópica de las colonias de *Brucella* spp. se logra entre los siete y los 21 días pero pueden necesitar hasta 35 días de incubación. Así, se recomienda hacer una resiembra a partir de la mezcla del recipiente antes de considerar el hemocultivo como negativo. En este sentido, los nuevos sistemas automatizados de hemocultivos del tipo BACTEC se han mostrado muy eficaces. Son sistemas basados en la detección inespecífica de crecimiento bacteriano por la producción y liberación de CO<sub>2</sub> en la atmósfera de la botella, lo que reduce el tiempo de incubación a 5-7 días. Con el método de lisis-centrifugación descrito por Etemadi y cols. en 1984 se reduce el tiempo de incubación de siete a tres días (Etemadi *et al.*, 1984). Este método consiste en la lisis osmótica de las células de la sangre seguida de un paso de centrifugación para concentrar los microorganismos antes de incubar el sedimento. Sin embargo, la tasa de contaminación por microorganismos ambientales y el riesgo que supone para el personal de laboratorio por aerosoles es superior al método de hemocultivo convencional.

El que las bacterias del género *Brucella* spp. crezcan lentamente en los medios de cultivo utilizados para su aislamiento, origina un retraso en el diagnóstico de la enfermedad que en algunas ocasiones puede superar las tres semanas. Además, si el clínico no avisa al personal de laboratorio de la sospecha clínica de brucelosis, los hemocultivos incubados en sistemas automáticos se descartan entre los cinco y siete días de incubación, lo que reduce la tasa de recuperación de la bacteria. Otra limitación no menos importante es que el uso de estos sistemas carece de una orientación diagnóstica sobre la bacteria que ha crecido, lo cual supone un riesgo entre el personal técnico del laboratorio que puede infectarse con la bacteria de forma accidental durante su manipulación. Además, los sistemas automáticos de cultivo y los sistemas de identificación de la especie no están disponibles en países en desarrollo o áreas rurales donde la enfermedad es endémica (Nimri, 2003). Por estas razones el examen microbiológico no siempre es factible, lo que hace que el diagnóstico se complemente con pruebas serológicas rápidas.

El diagnóstico bacteriológico de las complicaciones de la brucelosis no sólo está limitado por la escasa rentabilidad del hemocultivo, sino por la dificultad de aislar *Brucella* spp. en otras muestras biológicas. Por ejemplo, la tasa de aislamiento del germen en líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo no supera el 20-40% (Colmenero *et al.*, 1996).

La baja frecuencia de aislamiento de *Brucella* spp. a partir de muestras clínicas y la ausencia de síntomas específicos hace que el diagnóstico de la brucelosis crónica se realice mediante una historia clínica detallada y los resultados de las pruebas serológicas. Sin embargo, las pruebas serológicas también presentan ciertas limitaciones.

### **Diagnóstico serológico**

El diagnóstico serológico de la brucelosis se realiza mediante tres pruebas clásicas: la prueba Rosa de Bengala (RB), la prueba de seroaglutinación estándar en tubo (SAT) o prueba de Wright y la prueba de Coombs anti-*Brucella* (Coombs). Mientras que en el episodio agudo todas estas pruebas son sensibles, sólo utilizando la prueba de Coombs se pueden descartar estadíos avanzados de la enfermedad.

Todas las pruebas serológicas convencionales utilizan como antígeno células lisas de *B. abortus* que permiten detectar anticuerpos dirigidos contra la cadena-O del LPS de las tres especies de *Brucella* spp. que causan enfermedad en el hombre, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. No se observan reacciones cruzadas con la cadena-O de las cepas rugosas de *Brucella* spp., *B. canis* y *B. ovis*, por lo que los métodos serológicos para la detección de anticuerpos frente a estas especies deben utilizar un antígeno específico de una u otra especie. Sin embargo, se ha observado reacción cruzada con otras bacterias, especialmente con *Y. enterocolitica* O:9 pero también con *Francisella tularensis*, *Aflia clevelandensis*, *Escherichia hermanni*, *E. coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Steantrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1 (Debeaumont *et al.*, 2005; Perry y Bundle, 1990). Más importante es el uso y la interpretación de los resultados en pacientes con antecedentes de brucelosis, en sujetos que están relacionados profesionalmente con *Brucella* spp., o en aquellos que residen en un área endémica donde hay alta prevalencia de anticuerpos anti-*Brucella* entre la población sana (Ariza *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta que los niveles de anticuerpos IgG e IgA se mantienen elevados incluso tras la recuperación del paciente, la limitación principal del diagnóstico serológico radica en la dificultad de distinguir entre enfermos y pacientes curados si atendemos sólo a estos parámetros (Ariza, 1988).

A continuación se describen las pruebas RB, SAT, Coombs anti-*Brucella*, ELISA y Brucellacapt<sup>®</sup>.

### ***Rosa de Bengala***

La prueba RB fue introducida por Morgan en 1969 (Morgan *et al.*, 1969). Es una prueba de aglutinación rápida en porta para la detección de anticuerpos IgM, IgG e IgA del suero problema cuando se enfrenta con el antígeno.

La prueba RB tiene especial utilidad en zonas no endémicas, donde se realiza como método de cribado por su rapidez, alta sensibilidad, especificidad y bajo coste (Ariza, 1996; Díaz *et al.*, 1976). Aunque se ha descrito una sensibilidad del 95-100% y una especificidad del 75-98% (Colmenero *et al.*, 1989, Gómez *et al.*, 2008; Martín Moreno *et al.*, 1992), pueden existir falsos negativos que se limitan a enfermos con

procesos de pocos días de evolución o estadios muy avanzados. Por este motivo, se aconseja confirmar el resultado con otras pruebas serológicas.

### ***Seroaglutinación***

La prueba de aglutinación en suero o SAT (de la terminología inglesa *Seroagglutination test*) detecta anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA.

Existe una variante de la prueba de SAT que pone de manifiesto la participación de las IgM. La prueba de SAT se realiza en presencia de un agente reductor como el 2-mercaptoetanol (2-ME) o el ditiotreitól (DTT) que rompe la actividad aglutinante de la IgM dejando la IgG intacta. De esta manera, el título remanente cuando se utiliza DTT o 2-ME en la prueba de SAT es debido únicamente a las IgG aglutinantes (Buchanan *et al.*, 1980; Reddin *et al.*, 1965; Young, 1991). Sin embargo, no hay consenso en la literatura acerca de cual es el título significativo de IgG resistentes a DTT indicativo de una infección crónica. Por este motivo, es una prueba que está indicada principalmente en el diagnóstico del episodio agudo. Un caso presuntivo de brucelosis aguda es aquel que muestra un título de aglutinación positivo igual o superior a 1/160 o cuando existe una elevación de cuatro veces el título entre la fase aguda y convaleciente (Buchanan *et al.*, 1974; Spink, 1956).

Se ha descrito una sensibilidad para la prueba de SAT del 83-95,5% y una especificidad del 97-100% (Buzgan *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2008; Mantecón *et al.*, 2008). A pesar de la alta sensibilidad del SAT, existen falsos negativos que se limitan a enfermos con pocos días de evolución o al denominado “efecto prozona”. Este efecto puede deberse a un exceso de anticuerpos a bajas diluciones del suero, a la presencia de factores inespecíficos del suero que inhiben la aglutinación, o a la presencia de anticuerpos específicos IgG no aglutinantes (anticuerpos incompletos) o anticuerpos bloqueadores IgA (Parma *et al.*, 1984; Rubio *et al.*, 2001). Aunque este efecto se ha descrito en la literatura para la mayoría de las pruebas serológicas, resulta un hecho ocasional (Foz y Garriga, 1954). En este sentido, los anticuerpos bloqueantes pueden ser identificados mediante la prueba de Coombs.



### ***Prueba de Coombs anti-Brucella***

La prueba de Coombs permite la detección de anticuerpos no aglutinantes o incompletos de las clases IgG e IgA (Parratt *et al.*, 1977; Zinneman *et al.*, 1964). El título obtenido es como mínimo el de la prueba de SAT y generalmente aumenta de manera muy significativa cuanto mayor es el tiempo de evolución de la enfermedad (Ariza *et al.*, 1992). Por esta razón, los resultados de la prueba de Coombs, junto con los de la prueba de SAT, dan una información aproximada de la evolución de la enfermedad (Ariza *et al.*, 1992).

Aunque se ha descrito una elevada sensibilidad y especificidad para la prueba de Coombs anti-*Brucella*, la complejidad de ejecución de esta prueba hace que no se realice de forma habitual en algunos laboratorios, por lo que muchos casos de brucelosis crónica quedan sin diagnosticar.

### ***Otras pruebas serológicas***

Otras pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis humana que muestran una gran sensibilidad y especificidad, pero cuyo empleo no se ha estandarizado para el diagnóstico de rutina en la mayoría de los laboratorios por su complejidad técnica, son los ensayos de enzimoimmunoanálisis, de inmunofluorescencia y de precipitación en gel.

Los **ensayos de enzimoimmunoanálisis** (ELISA, de la terminología inglesa *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) permiten detectar y cuantificar por separado las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA anti-*Brucella* (Ariza *et al.*, 1992). El antígeno empleado ha sido muy diverso: células enteras (Magee, 1980; De Klerk y Anderson, 1985), LPS purificado (Ariza *et al.*, 1992; Pellicer *et al.*, 1988), proteínas de membrana externa (Araj y Kaufmann, 1989) y proteínas citoplasmáticas (Goldbaum *et al.*, 1992). Algunos estudios reportan sensibilidades entre el 78 y el 83% y una especificidad del 98% para detectar anticuerpos IgG (Araj *et al.*, 1986; Ciftçi *et al.*, 2005).

La prueba de ELISA-IgA, y especialmente la prueba de ELISA-IgG, tienen una correlación muy alta con la prueba de Coombs anti-*Brucella*. La información que

aportan los métodos de ELISA, junto con la posibilidad de ser introducido a gran escala sin grandes dificultades técnicas y por su coste aceptable, hizo pensar que el ELISA-IgM sustituiría a la prueba de SAT y el ELISA-IgG a la prueba de Coombs en el diagnóstico habitual. Sin embargo, el uso de esta prueba ha tropezado con la inexistencia de una estandarización adecuada de los sistemas comerciales. Así, su empleo generalizado no es aconsejable en tanto no se produzca esta estandarización (Ariza, 2002).

Recientemente se ha desarrollado en nuestro país una prueba de inmunocaptura-aglutinación denominada **Brucellacapt**<sup>®</sup> (Vircell S.L, Santa Fé, Granada) para la detección de anticuerpos totales frente a *Brucella* spp. Basada en la prueba de Coombs anti-*Brucella*, esta prueba permite la detección de anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes de las clases IgG e IgA, de una forma rápida y sencilla. Se ha descrito una sensibilidad y especificidad superponible a la de la prueba de Coombs, sobre todo entre los títulos 1/40 y 1/2560, por lo que podría sustituirla (Alişkan *et al.*, 2007; Casao *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2008; Orduña *et al.*, 2000; Serra *et al.* 2001; Velasco *et al.*, 1998).

Otras pruebas más sencillas son las denominadas **Dipstick** y **Brucella IgM/IgG Flow Assay**, ambas descritas por Smits y cols. (Smits *et al.*, 1999; Smits *et al.*, 2003). La primera es una prueba colorimétrica que identifica anticuerpos IgM específicos para *Brucella* spp. mediante una cinta de nitrocelulosa impregnada de anticuerpos monoclonales anti-IgM humana. La prueba se cuantifica en cruces, ha demostrado ser muy sensible y específica y se considera especialmente apropiada para el diagnóstico en lugares con pocos recursos económicos. Sin embargo, carece de utilidad en el diagnóstico de la brucelosis crónica (Casao *et al.*, 2003). La segunda es una versión simplificada del ELISA que consiste en una inmuno-cromatografía que permite la detección de anticuerpos IgM e IgG frente al LPS de *Brucella* spp.

### **Diagnóstico molecular**

Desde que a mediados de los años 80 Kary Mullis inventara la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, la amplificación *in vitro* de cualquier secuencia genómica se ha

convertido en una herramienta fundamental en el diagnóstico de muchas enfermedades humanas.

En los últimos 20 años se han desarrollado numerosos ensayos basados en la PCR, que podrían salvar las limitaciones del diagnóstico bacteriológico y serológico de la brucelosis humana. Aunque de forma ocasional, la amplificación de ADN de *Brucella* spp. ha permitido la confirmación de la enfermedad en pacientes con hemocultivo positivo y serología convencional negativa (Khorvash *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 1996), pacientes con hemocultivos negativos y serología positiva no concluyente (Belo *et al.*, 2007; Purwar *et al.*, 2006), o casos atípicos o raros como el de una prótesis de rodilla infectada (Marbach *et al.*, 2007).

Además, no hay que olvidar que *Brucella* spp. es un patógeno de clase III que requiere condiciones de seguridad especiales para su manipulación. Los ensayos de PCR convencional y/o en tiempo real no requieren la manipulación directa del patógeno, por lo que una ventaja adicional es que se reduce considerablemente el riesgo de contagio entre el personal de laboratorio.

### ***Ensayos de PCR convencional***

En 1990, Fekete y cols. publicaron el primer ensayo de PCR convencional para la amplificación de un fragmento de 645 pb de un gen que codifica una proteína de la membrana externa de la cepa 19 de *B. abortus*, con una sensibilidad analítica de 0,1 pg de ADN, equivalente a menos de 100 bacterias (Fekete *et al.*, 1990). Esta proteína de 43kDa está presente en 25 cepas de *Brucella* spp., representando las seis especies clásicas y sus biovariedades.

Desde entonces, salvando los estudios de polimorfismos, se han desarrollado numerosos ensayos basados en ésta y otras secuencias del genoma de *Brucella* spp. con utilidad en el diagnóstico de la brucelosis animal o humana, como secuencias que codifican para proteínas de la membrana externa (Baily *et al.*, 1992; Leal-Klevezas *et al.*, 1995a; Leal-Klevezas *et al.*, 1995b; Sifuentes-Rincón *et al.*, 1997), ARNr 16S (Herman y De Ridder, 1992; Romero *et al.*, 1995a), secuencias espaciadoras entre el ARNr 16S y el ARNr 23S (Fox *et al.*, 1998; Keid *et al.*, 2007; Rijpens *et al.*, 1996), el

eritritol (Bricker y Halling, 1995), *virB2* (Kim S *et al.*, 2006) o elementos de inserción (Bricker y Halling, 1994; Cloeckaert *et al.*, 2000).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa una de las pocas técnicas con potencial para la detección de todas las especies conocidas de *Brucella* spp. El primer ensayo de PCR convencional para la discriminación de ADN de *Brucella* spp. a nivel de especie fue el desarrollado por Bricker y Halling en 1994, al que denominaron AMOS PCR (Bricker y Halling, 1994). Mediante el empleo de cinco parejas de cebadores, este ensayo permite diferenciar las biovariedades 1, 2 y 4 de *B. abortus*, todas las biovariedades de *B. melitensis*, *B. ovis* y la biovariedad 1 de *B. suis* (Bricker *et al.*, 1994). Un año más tarde, estos autores publicaron una extensión de este ensayo que permitía detectar además las cepas vacunales S19 y RB51 de *B. abortus* (Bricker y Halling, 1995). Recientemente, López-Goñi y cols. han desarrollado un ensayo de PCR múltiple que permite la amplificación de ADN de las seis especies clásicas y sus biovariedades, las especies marinas *B. ceti* y *B. pinnipedialis* y las cepas vacunales *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev-1 (López-Goñi *et al.*, 2008).

Algunos ensayos de PCR únicamente se han evaluado en cultivo puro de la bacteria, (Herman y DeRidder, 1992; Cloeckaert *et al.*, 2000; Da Costa *et al.*, 1996; Sifuentes-Rincón *et al.*, 1997; Lübeck *et al.*, 2003), otros, sin embargo, se han probado también en tejidos de animales o productos derivados (Amin *et al.*, 2001; Adone *et al.*, 2001; Baek *et al.*, 2003; Cetinkaya *et al.*, 1999; Cloeckaert *et al.*, 2000; Cortez *et al.*, 2001; Fekete *et al.*, 1992; Gallien *et al.*, 1998; Guarino *et al.*, 2000; Hamdy y Amins, 2002; Leal-Klevezas *et al.*, 1995a; Leal-Klevezas *et al.*, 1995b; Leal-Klevezas *et al.*, 2000; Leyla *et al.*, 2003; Manterola *et al.*, 2003; Richtzenhain *et al.*, 2002; Rijpens *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1995b; Serpe *et al.*, 1999; Sreevatsan *et al.*, 2000; Tantillo *et al.*, 2001; Tantillo *et al.*, 2003). Además, algunos autores han desarrollado métodos basados en la PCR en combinación con ensayos de enzimoimmunoanálisis (Morata *et al.*, 2003; Queipo-Ortuño *et al.*, 2004; Vrioni *et al.*, 2004).

Ciertos ensayos, como los descritos por Baily, Da Costa Rijpens y Romero pueden dar falsos positivos por amplificación de ADN de *Ochrobactrum* spp., bacteria

relacionada filogenéticamente con *Brucella* spp. (Baily *et al.*, 1992; DaCosta *et al.*, 1996; Rijpens *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1995a). Para salvar esta limitación, recientemente se ha descrito un ensayo de PCR basado en una secuencia del gen *recA*, para identificar y diferenciar *Brucella* spp., *Ochrobactrum anthropi* y *Ochrobactrum intermedium*, que por el momento sólo se ha testado en cultivo puro (Scholz *et al.*, 2008).

De todos los ensayos, el descrito por Baily es uno de los más utilizados y que mayor sensibilidad ha mostrado tanto en cultivo puro como en muestras clínicas (Al-Dahouk *et al.*, 2007; Mitka *et al.*, 2007). El tipo de muestra más utilizada ha sido la sangre seguida del suero. En la Tabla 1 se recogen la sensibilidad y especificidad de diversos estudios de ensayos basados en la técnica de PCR convencional aplicados en muestras de sangre y suero. No obstante, dependiendo de las manifestaciones clínicas del paciente, se han empleado otros tipos de muestras como pus de un absceso hepatoesplénico, LS, LCR, esputo, orina, hueso, tiroides o riñón (Colmenero *et al.*, 2000b, Morata *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 1996).

**Tabla 1.** Sensibilidad y especificidad de diversos estudios basados en ensayos de PCR convencional aplicados en muestras de sangre y suero de pacientes con brucelosis.

Referencia	Cebadores/diana	Muestra	Casos	Sensibilidad (%)	Controles	Especificidad (%)
Matar 1996	B4-B5/BCSP31	Sangre	20	100	39	100
Queipo-Ortuño 1997	B4-B5/BCSP31	Sangre	47	100	60	98
Morata 1999	B4-B5/BCSP31	Sangre	30	97	ND	ND
Navarro 1999	B4-B5/BCSP31	Sangre	10	50	5	60
Al-Attas 2000	B4-B5/BCSP31	Sangre	17	82	33	88
Zerva 2001	B4-B5/BCSP31	Sangre	31	97	45	100
		Suero	31	94	45	100
	JPF-JPR/Omp-2	Sangre	10	40	16	100
		Suero	10	60	16	100
Al-Nakkas 2002	O1-O2/IS711	Sangre	28	100	56	100
Cirak y Hize 2002	ND/IS711	Sangre	29	52	ND	ND
	ND/BCSP31	Sangre	29	48	ND	ND
Colmenero 2002b	B4-B5/BCSP31	Sangre	7	100	ND	ND
Nimri 2003	BDDP kit	Sangre	165	73	50	100
Al-Nakkas 2005	O1-O2/IS711	Sangre	199	97	424	100
Elfaki 2005 (a)	B4-B5/BCSP31	Sangre	25	96	25	100
		Suero	25	96	25	100
Elfaki 2005 (b)	B4-B5/BCSP31	Sangre	20	70	ND	ND
Mitka 2007	B4-B5/BCSP31	Sangre	200	99	100	100
		Suero	200	97	100	100
	JPF-JPR/Omp-2	Sangre	200	98	100	100
		Suero	200	95	100	100
	P1-P2/Omp-2	Sangre	200	99	100	100
		Suero	200	97	100	100
	26A-26B/Omp-28	Sangre	200	98	100	100
		Suero	200	96	100	100
Baddour y Alkhalifa 2008	B4-B5/BCSP31	Sangre	147	98	50	100
	JPF-JPR/Omp-2	Sangre	147	88	50	100
	F4-R2/ARNr 16S	Sangre	147	53	50	100

B4-B5: cebadores descritos por Baily *et al.* (1992) para la amplificación de una secuencia de 223 pb del gen BCSP31 que codifica para una proteína de la membrana externa de *B. abortus*; JPF-JPR: descritos por Leal-Klevezas *et al.* (1995(a)) para una secuencia de 193 pb del gen Omp-2 (proteína de la membrana externa de *Brucella* spp.); BDDP: *Brucella DNA Detect PCR kit*; O1-O2: Al-Attas *et al.* (2000) para una secuencia de 52pb del elemento de inserción (IS711) de *Brucella* spp.; P1-P2: Bardenstein *et al.* (2002) para una secuencia de 282 pb de gen Omp-2; 26A-26B: Cloeckart *et al.* (2000) para una secuencia de 1.029 pb del gen Omp-28; F4-R2: Romero *et al.* (1995) una secuencia de 905 pb del ARNr 16S de *Brucella* spp.; ND: no hay datos.

### ***Ensayos de PCR en tiempo real***

La técnica de PCR en tiempo real (PCRtr) es básicamente una PCR convencional en la que los termocicladores llevan acoplados un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro) y una cámara CCD (dispositivo de carga acoplada) capaz de registrar el proceso en todo momento. De esta forma, las manipulaciones post-amplificación para la visualización del producto en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se hacen innecesarias, evitando posibles contaminaciones cruzadas entre las muestras analizadas y reduciendo considerablemente el tiempo de ejecución del ensayo. Así, el proceso puede completarse en menos de una hora frente a las más de dos horas que supone una PCR convencional.

Esta variante de la PCR permite detectar el ADN diana al mismo tiempo que el producto o fragmento de ADN diana se va formando, gracias a la fluorescencia que el mismo emite durante su amplificación. Cuando el fluoróforo, previamente añadido a la mezcla de reacción, se une a la doble cadena de ADN aumenta notablemente la emisión de fluorescencia. Así, la emisión de la fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Para la emisión de la fluorescencia se han desarrollado distintos sistemas, agentes intercalantes como el SYBR Green o sondas marcadas con fluoróforos (revisado en Navarro, 2009), algunos de los cuales, como la sonda de hidrólisis o tipo TaqMan empleada en este estudio, permiten la cuantificación del producto amplificado. La cuantificación de la concentración inicial de ácido nucleico presente en la muestra se realiza de una manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor (5-6 log) que en los procedimientos convencionales (2-4 log).

Desde que en 2001 Redkar y cols. (Redkar *et al.*, 2001) publicaran el primer ensayo basado en la técnica de PCRtr para la detección de ADN de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* se han sucedido varios ensayos que permiten la detección y/o cuantificación de ADN de *Brucella* spp. (Tabla 2).

**Tabla 2.** Ensayos de PCRtr para la detección y/o cuantificación de ADN de *Brucella* spp.

Referencia	Cebadores/diana	Sistema de detección de fluorescencia	Género y especie
Redkar 2001*	c.s. común-c.a. específico de especie/IS711	Sondas FRET	<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i>
Newby 2003*	BAF-BAR/alkB-IS711	Sondas FRET, Sonda Taqman, SybrGreen I	<i>B. abortus</i>
Sohn 2003*	B4-B5/BCSP31	Sonda TaqMan	<i>Brucella</i> spp.
Probert 2004*	c.s. específico-c.a. específico/BCSP31	Sonda TaqMan	<i>Brucella</i> spp
	c.s. específico-c.a. específico/IS711	Sonda TaqMan	<i>B. abortus</i>
	c.s. específico-c.a. específico/IS711	Sonda TaqMan	<i>B. melitensis</i>
Bogdanovich 2004*	bruc1-bruc2/per	Sonda TaqMan	<i>Brucella</i> spp.
Queipo-Ortuño 2005 <sup>a</sup>	B4-B5/BCSP31	SybrGreen I	<i>Brucella</i> spp.
Debeaumont 2005	B4-B5/BCSP31	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp.
Navarro 2006	EFQ1-ERQ2/BMEI1162	Sonda TaqMan	<i>B. melitensis</i>
Al-Dahouk 2007*	B4-B5/BCSP31	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp.
Kattar 2007	Bru ITS-S-Bru ITS-A/ 16S-23S ITS	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp.
	Bru 25-S-Bru 24-A/Omp25	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp.
	Bru-31-F-Bru-31-R/Omp31	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp. (excepto <i>B. abortus</i> )
Vrioni 2008	B4-B5/BCSP31	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp.
Queipo-Ortuño 2008	B4-B5/BCSP31	Sonda TaqMan	<i>Brucella</i> spp.
Bounaadja 2009*	IS421-IS511/IS711	Sondas TaqMan	<i>Brucella</i> spp.
	BCSP1163-BCSP1199/BCSP31	Sondas TaqMan	<i>Brucella</i> spp.
	Per525-Per575/per	Sondas TaqMan	<i>Brucella</i> spp.
Queipo-Ortuño 2009	B1-B2/BCSP31	Sondas FRET	<i>Brucella</i> spp., <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Surucuoglu 2009	RBGD kit	RBGD kit	<i>Brucella</i> spp.

\*: testado en cultivo puro; c.s.: cebador sentido; c.a.: cebador antisentido para la amplificación de una secuencia de 113 bp de *B. abortus*, 252 pb de *B. melitensis* y 170 pb del IS711 de *B. suis*; BAF-BAR: Newby *et al.* (2003) para una secuencia de 156 pb de *B. abortus* que incluye el gen alkB y el IS711; B4-B5: Bailly *et al.* (1992) para 223 pb del gen BCSP31; bruc1-bruc2: Lübeck *et al.* (2003) para una secuencia del gen *per* (perosamina sintetasa de *Brucella* spp.); EFQ1-ERQ2: Navarro *et al.* (2006) para 251 pb de *B. melitensis*; Bru ITS-S-Bru ITS-A: Kattar *et al.* (2007) para 147 pb de la secuencia espaciadora 16S-23S ITS; Bru 25-S-Bru 25-A: Kattar *et al.* (2007) 141 pb de Omp25; Bru 31-F-Bru 31-R: Kattar *et al.* (2007) para 281 pb de Omp31; IS421-IS511: Bounaadja *et al.* (2009) para 178 pb de IS711 de *Brucella* spp.; BCSP1163-BCSP1199: Bounaadja *et al.* (2009) para 55 pb de BCSP31 *Brucella* spp.; Per525-Per575: Bounaadja *et al.* (2009) para 68 pb de *per* de *Brucella* spp.; B1-B2: Queipo-Ortuño *et al.* (2009) para 207 pb de BCSP31 de *Brucella* spp; RBGD kit: RoboGene *Brucella* Detection kit.



La mayoría de los ensayos de PCRtr descritos en la Tabla 2, que han empleado muestras procedentes de pacientes con brucelosis, han utilizado muestras de sangre o suero; no obstante, algunos de estos ensayos se han testado también en otros tipos de muestras como LS, LCR, orina, pus de abscesos hepatoesplénicos, biopsia de ganglio linfático, líquido pleural, tejido cardíaco, óseo, renal, tiroideo o tejido de pulmón (Navarro-Martínez *et al.*, 2009; Queipo-Ortuño *et al.*, 2005; Queipo-Ortuño *et al.*, 2006; Queipo-Ortuño *et al.*, 2009; Theegarten *et al.*, 2008). En la Tabla 3 se recogen la sensibilidad y especificidad de diversos estudios de ensayos basados en la técnica de PCRtr aplicadas en muestras de sangre o suero.

**Tabla 3.** Sensibilidad y especificidad de diversos estudios de ensayos basados en la técnica de PCRtr aplicados en muestras de sangre o suero de pacientes con brucelosis.

Referencia	Muestra	Casos	S (%)	Controles	E (%)	Cuantificación*
Debaumont 2005	Suero	17	65	35	100	8-650 cop./5µl de ADN
Queipo-Ortuño 2005(a)	Suero	60	93	37	95	NC
Queipo-Ortuño 2005(b)	Suero	60	92	65	95	NC
Navarro 2006	Sangre	18	100	30	100	7-4982 cop./ml de muestra
Kattar 2007	Sangre	340	66,7	299	99,7	NC
Vrioni 2008	Sangre	39	100	50	100	803 ± 1236 cop./5µl de ADN
Queipo-Ortuño 2008(a)	Suero	46	93	64	98	8,2 x 10 <sup>6</sup> cop./ml de muestra
Surucuoglu 2009	Suero	50	88	30	100	NC

S: sensibilidad; E: especificidad; cop.: copias; NC: no cuantifica; \* cuantificación en muestras basales (rango media).

## TRATAMIENTO DE LA BRUCELOSIS HUMANA

El principal objetivo en el tratamiento de la brucelosis es mejorar los síntomas, reducir complicaciones y prevenir recidivas (Solera, 2000). Aunque un régimen adecuado permite la recuperación completa de la mayoría los pacientes, la aparición de recidivas y de complicaciones de la enfermedad constituyen un reto en el tratamiento. La principal causa de aparición de cronicidad es el retraso en el diagnóstico y tratamiento del paciente. En un estudio realizado por Buchanan y cols. en 1974, 160 pacientes diagnosticados de brucelosis aguda encontrando que los pacientes que se

trataron antes presentaron menos complicaciones que aquellos que recibieron el tratamiento más tarde (Buchanan, 1974). Éste y muchos otros autores coinciden en que la probabilidad de aparición de complicación focal aumenta con el tiempo de incubación antes de que el paciente sea tratado, por lo que es importante que el paciente reciba el tratamiento adecuado dentro del primer mes del inicio de los síntomas (Buchanan *et al.*, 1974; Spink, 1956; Ariza *et al.*, 1992; Colmenero *et al.*, 1996; Mousa *et al.*, 1988; Landau *et al.*, 1999). El manejo de pacientes con brucelosis crónica continúa siendo un reto, puesto que el ser tratado de nuevo resulta de poco beneficio (Young y Corbel, 1995).

Los antibióticos usados habitualmente en el tratamiento de la infección por *Brucella* spp. son tetraciclinas, aminoglicósidos, rifampicina y quinolonas. Las tetraciclinas siguen siendo los agentes de elección. Aunque la doxiciclina es el más empleado por su elevada actividad frente a *Brucella* spp. (Bosh *et al.*, 1986), baja toxicidad y bajo coste, aparición de recidivas se mantiene como uno de los principales inconvenientes. La combinación de tetraciclinas y estreptomicina reduce la frecuencia de recidivas y la incidencia de complicaciones (Solera, 1997). Otro antimicrobiano de baja toxicidad y fácil administración es la rifampicina. Aunque se ha empleado en monoterapia para el tratamiento de la brucelosis, la frecuente aparición de recidivas y de cepas resistentes a este compuesto han aconsejado su uso en combinación con otros antibióticos especialmente doxiciclina. La última recomendación de la OMS data de 1986 y sugiere la opción de doxiciclina 100 mg/12h oral más rifampicina 600-900 mg/día oral durante un mínimo de 6 semanas, pudiéndose sustituir la rifampicina por estreptomicina 15 mg/kg intramuscular durante dos semanas (WHO, 1986). Esta última se ha mostrado como la más efectiva (Solera *et al.*, 1994; Solera *et al.*, 1995) y se ha aceptado como la opción más adecuada en la actualidad (Ariza *et al.*, 2007; Skalsky *et al.*, 2008). Una posible explicación a esta diferencia es la interacción de rifampicina y doxiciclina (Colmenero *et al.*, 1994).

Las quinolonas poseen una excelente actividad bactericida contra *B. melitensis* en cultivo puro (García-Rodríguez *et al.*, 1995). Sin embargo, en la clínica no se han mostrado muy efectivas. Este hecho estar relacionado con la carencia de actividad bactericida de las quinolonas en el medio ácido intracelular del fagolisosoma, pues se ha

descrito que la actividad de las quinolonas es de dos a dieciséis veces menor a pH 5.0 que a pH 7.0 (García-Rodríguez *et al.*, 1994). Otro agente terapéutico que también se emplea es el cotrimoxazol o trimetoprin-sulfametoxazol (TMP-SMZ), sobre todo durante periodos de entre tres y seis meses o en combinación con aminoglucósidos, rifampicina y tetraciclinas. Otros antibiótico en estudio es la azitromicina que, a pesar de mostrar buena eficacia *in vitro* sigue siendo menos efectiva que la doxiciclina en la curación de la enfermedad (Domingo *et al.*, 1995).

Las pautas recomendadas según la edad del paciente y la presencia o no de focalidad se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Tratamiento de la brucelosis humana (Solera, 2000).

Situación	Recomendado (días)	Alternativo (días)
Brucelosis aguda en adultos y niños mayores de 8 años	Dox. (45) + Estrept. 15 mg/kg/24h im. (14-21) o Gent. 3-5 mg/kg/24h i.v. (7-14) o,  Dox. (45) + Rif. (45)	Rif. (42) + ofloxacina 400 mg/12h oral o ciprofloxacino 750 mg/12h oral (42) o,  Dox. + TMP-SMZ/12h (56)
Niños menores de 8 años	TMP-SMZ 5 mg/kg/12h oral (45) + Gent. 5-6 mg/kg/24h i.v. (7)	Rif. 15 mg/kg/24h oral (45) + Gent. 5-6 mg/kg/24h i.v. (7)
Complicaciones focales	Dox. + Rif. (42-364) y Estrept. 1g/24h i.m. o Gent. 3-5 mg/kg/24h i.v. (14-21)	ciprofloxacino 750 mg/12h oral + ofloxacino 400 mg/12h oral*
Brucelosis durante el embarazo	Rif. (45) + TMP-SMZ/12h (45)	Rif. (45)
Accidente laboratorio	Dox. + Rif. (21-42)	

Dox.: doxiciclina oral (100 mg/12h); Estrept.: estreptomina; Rif.: rifampicina oral (600-900 mg/24h); Gent.: gentamicina; i.m.: intramuscular; i.v.: intravenoso; \*: los pacientes con espondilitis, endocarditis o neurobrucelosis requieren tratamientos prolongados (6-12 meses). La cirugía debe considerarse en casos de endocarditis, abscesos cerebrales, hepáticos o esplénicos o en aquellos abscesos resistentes al tratamiento antimicrobiano.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



## Hipótesis General

Tras un episodio de brucelosis, la probabilidad de detección de ADN de *Brucella melitensis* es mayor en pacientes con brucelosis crónica (enfermedad focal y/o síntomas inespecíficos persistentes) que en sujetos que permanecen asintomáticos.

## Objetivo Principal

- Evaluar la utilidad de un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (PCRQtr) en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con brucelosis crónica.

## Objetivos Secundarios

- Describir las características clínicas y de laboratorio de una cohorte de sujetos con antecedentes de brucelosis clasificada en tres grupos: pacientes con enfermedad focal, pacientes con síntomas inespecíficos y sujetos asintomáticos.
- Detectar y cuantificar ADN de *B. melitensis* en sangre, suero y otros tipos de muestras clínicas de la cohorte de estudio.
- Comparar el número de copias de ADN de *B. melitensis* por mililitro de muestra clínica (carga bacteriana) en los tres grupos de sujetos.
- Analizar la evolución de la carga bacteriana antes, durante y después del tratamiento antimicrobiano.
- Determinar si existe relación entre la presencia de ADN de *B. melitensis* y la respuesta inmunitaria medida por la presencia de anticuerpos anti-*Brucella*.
- Comparar los resultados obtenidos mediante el ensayo de PCRQtr en sangre y suero para determinar si un tipo de muestra puede reemplazar a la otra.





## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, longitudinal y prospectivo de una cohorte de 38 sujetos con antecedentes de brucelosis atendidos en la consulta externa del Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA), en el periodo comprendido entre Febrero de 2003 y Febrero de 2010.

El estudio consta de dos partes. Por un lado, la descripción epidemiológica, clínica y evolutiva de la cohorte. Por otro, la evaluación de un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (PCRQtr) para la detección y cuantificación de ADN de *Brucella melitensis* en muestras de sangre y suero. Los resultados obtenidos se comparan con los métodos de diagnóstico clásicos: hemocultivo y pruebas serológicas clásicas para la detección de inmunoglobulinas anti-*Brucella* (Rosa de Bengala o RB, seroaglutinación o SAT y Coombs) y, una prueba serológica no convencional, la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup>.

Las pruebas RB, Brucellacapt<sup>®</sup> y el ensayo de PCRQtr se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación del CHUA. El hemocultivo y las pruebas serológicas SAT y Coombs anti-*Brucella* se llevaron a cabo por personal del Servicio de Microbiología de dicho hospital. Además, se escogieron al azar 10 de las muestras de suero y se enviaron a los Laboratorios Vircell, S.L (Granada) para su evaluación mediante las pruebas serológicas clásicas, la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup>, ELISA IgM y ELISA IgG. Asimismo, 10 muestras del paciente nº16 se remitieron al Dr. Ramón Díaz del Hospital Universitario de Pamplona (Navarra) para su evaluación mediante las pruebas serológicas clásicas, la prueba de doble difusión en gel (DDG) y la prueba de inmunodifusión radial (IDR).

## SUJETOS

### Grupo control

El grupo control estaba formado por los siguientes sujetos:

- 20 sujetos sanos procedentes del banco de sangre del CHUA,
- 3 sujetos sanos sin antecedentes de brucelosis pero expuestos a *Brucella* spp., y

- 15 pacientes con síndromes febriles que, inicialmente, plantearon un diagnóstico diferencial con la brucelosis, y en los que se comprobó ausencia de la misma:
  - 4 pacientes con bacteremia (dos casos debido a *Escherichia coli*, uno debido a *Staphylococcus hominis* y uno debido a *Streptococcus pneumoniae*)
  - 4 pacientes con espondilodiscitis (uno debido a *Mycobacterium tuberculosis*, uno debido a *Klebsiella* spp., uno debido a *E. coli* y *Proteus* spp. y uno debido a *Staphylococcus aureus*),
  - 1 paciente con osteomielitis por *S. aureus* meticilina resistente,
  - 1 paciente con celulitis del miembro inferior derecho por *Pseudomonas aeruginosa*,
  - 1 paciente con piomiositis por *S. aureus*, 1 paciente con un absceso hepático por *E. coli*,
  - 1 paciente con empiema pleural por *Bacillus* spp.
  - 1 paciente con tuberculosis pulmonar y,
  - 1 paciente con adenocarcinoma de pulmón.

Todos los sujetos incluidos en este grupo se evaluaron mediante las pruebas serológicas clásicas y la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup>, excepto los 20 donantes sanos a cuyas muestras no se les realizó la prueba de SAT ni la prueba de Coombs. En total se obtuvieron 84 muestras (42 muestras de sangre y 42 muestras de suero).

### **Grupo de estudio**

Se incluye una cohorte de 38 sujetos con una historia bien documentada de brucelosis, diagnosticada entre 3 y 33 años antes de su inclusión en el estudio. Atendiendo a la evolución clínica, los sujetos se clasificaron en tres grupos:

- Grupo A: pacientes con enfermedad focal, diagnosticada mediante clínica y pruebas de imagen (radiología simple, ecografía, gammagrafía o RMN) u otras pruebas como la biopsia o el electroneurograma.
- Grupo B: pacientes que presentan síntomas inespecíficos tales como artralgias, mialgias y/o astenia.
- Grupo C: sujetos asintomáticos.

El paciente con brucelosis crónica se definió como aquel que tras un episodio de brucelosis aguda y después de completar un tratamiento antibiótico adecuado permanece con síntomas durante más de un año, con o sin focalidad. Los síntomas pueden ser propios de su enfermedad focal o inespecíficos, tales como astenia, fatiga, malestar general, cefalea, febrícula, artromialgias, anorexia o pérdida de peso de causa desconocida.

### ***Proceso de selección***

Los sujetos se seleccionaron de una de las siguientes formas:

- se llamaron por teléfono a partir de un listado de todos los casos diagnosticados y tratados de brucelosis en el Servicio de Medicina Interna del CHUA desde el año 1975,
- se encontraban en seguimiento clínico de un episodio de brucelosis aguda o,
- acudieron a la consulta por decisión propia o remitidos por otros especialistas.

### ***Criterios de inclusión***

- Tener una historia previa de brucelosis bien documentada. Un episodio de brucelosis aguda está bien documentado si cumple alguno de los siguientes criterios:
  - Aislamiento de *Brucella* spp. en sangre o cualquier otra muestra de tejido o,
  - Presencia de un cuadro clínico compatible (fiebre, sudoración, artralgias, hepatomegalia, esplenomegalia, y/o signos de enfermedad focal), junto a la demostración de anticuerpos específicos a títulos significativos considerándose concluyentes uno de los siguientes:
    - Prueba de SAT positiva a títulos iguales o superiores a 1/160.
    - Prueba de Coombs positiva a títulos iguales o superiores a 1/320.
    - Seroconversión de cualquiera de las dos pruebas anteriores cuatro o más veces el título inicial entre dos muestras consecutivas de suero, separadas entre sí al menos dos semanas.

- Haber transcurrido al menos tres años desde la finalización del tratamiento antimicrobiano del último episodio de brucelosis aguda.
- Aceptar libre y voluntariamente la participación en el estudio tras leer la hoja de información al paciente y rellenando y firmando el modelo de consentimiento informado (Anexo), previamente aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del centro.

#### ***Criterios de exclusión***

- No cumplir alguno de los criterios de inclusión.
- Presentar una recidiva microbiológica, definida como la nueva positividad de los hemocultivos después de finalizado el último tratamiento antimicrobiano.
- No disponer de un seguimiento clínico y de laboratorio mínimo de tres meses.

### **PROTOCOLO GENERAL DE ESTUDIO**

En la primera visita y revisiones posteriores, todos los sujetos se sometieron a un examen clínico detallado y a las exploraciones complementarias pertinentes que permitieran descartar otras enfermedades.

Cada vez que un sujeto se atendió en la consulta, personal de enfermería le extrajo una muestra de sangre periférica en tubos con y sin anticoagulante; éste último para la obtención en paralelo de la muestra de suero. De forma puntual también se obtuvo otro tipo de muestras biológicas.

Los controles clínicos y de laboratorio se hicieron con una frecuencia dependiente de la disponibilidad del sujeto y de su evolución clínica.

Algunos de los pacientes del grupo de estudio recibieron tratamiento antimicrobiano durante la realización del mismo. La evolución clínica de estos pacientes se midió según presentaran o no síntomas clínicos tras la finalización del tratamiento antimicrobiano, distinguiéndose en ausencia de mejoría o fallo terapéutico, mejoría transitoria de los síntomas o, mejoría permanente de los síntomas o curación.

## TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS

Se obtuvieron un total de 778 muestras, 388 muestras de sangre, 386 muestras de suero, una muestra de LCR, una muestra de LS, una muestra de médula ósea y una biopsia de válvula aórtica. El número de muestras analizadas por cultivo, serología y el ensayo de PCRQtr se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Número de muestras analizadas y pruebas realizadas.

Tipo de muestra clínica	Cultivo	RB	SAT	Coombs	Brucellacapt®	PCRQtr
Sangre	60	-	-	-	-	396
Suero	-	394	312	308	386	394
LCR	1	-	-	-	-	1
LS	1	-	-	-	-	1
Médula ósea	1	-	-	-	-	1
Válvula aórtica	-	-	-	-	-	1

LCR: líquido cefalorraquídeo; LS: líquido sinovial; RB: Rosa de Bengala; Coombs: Coombs anti-*Brucella*; PCRQtr: PCR cuantitativa en tiempo real.

## MATERIAL Y EQUIPAMIENTO DE LABORATORIO

Agarosa (Pronadisa, Madrid, España).

Agitador *Vortex Fine PCR* (Steriltech, Madrid, España).

Bisturí.

Bloque de refrigeración (Roche, Mannheim, Alemania).

Bloque termostático *Thermostat Plus* (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Campana de flujo laminar *MiniV-PCR* (Telstar, Terrasa, España).

Capilares de 20 µl *LightCycler* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Cebadores y sonda TaqMan (Sigma-Genosys; [www.sigma.com/oligos](http://www.sigma.com/oligos)).

Centrífuga de mesa GS-15R (Beckman Coulter, Fullerton, California, EE.UU.).

Cloruro magnésico (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Congelador -20°C (Zanussi, Valenoncello, Italia).

Cubeta de electroforesis (EVT 200 Edvotek, Ecogen, Madrid, España).

*DNA Gel Extraction Montage kit* (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE.UU.).

Espectofotómetro *NanoDrop<sup>TM</sup>* modelo ND-100 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, EE.UU.).

Frigorífico 2-8°C (Siemens, Nürnberg, Alemania).

Fuente de electroforesis (EVT 200 Edvotek, Ecogen, Madrid, España).

Incubadora (Mettler GmbH, Schwabach, Alemania).

*LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe kit* (Roche, Penzberg, Alemania).

Liofilizador *Speed Vac Plus* SC-110 (Savant, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Marcador de peso molecular IX 72-1353 pb (Roche, Mannheim, Alemania).

Microondas (Bluesky).

Micropipetas de 0,5-10 µl, 10-100 µl y 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

Pipeta multicanal 8 (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

Pinzas metálicas de 12 cm.

Plásmido *pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Puntas con filtro de 0,1-10 µl y 10-100 µl estériles (VWR Internacional, Barcelona, España).

*QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).

Rotor S4180 para centrífuga de mesa (Beckman Coulter, Fullerton, California, EE.UU.).

Sacarosa (Sigma, Steinheim, Alemania).

Sistema de fotodocumentación modelo IP-010-SD (Vilber Lourmat, Torcy, Francia).

Solución con detergente *DNA Remove* (Real-Durviz, Valencia, España).

Tampón Tris-Bórico-EDTA (TBE) 10X (National Diagnostics, Atlanta, EE.UU.).

Tampón fosfato salino (PBS) (Dulbecco's; Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, Reino Unido).

Tampón de carga azul de bromofenol (Sigma, Steinheim, Alemania).

Termociclador *LightCycler* modelo 1.5 (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Transiluminador ultravioleta modelo TS-10 (Edvotek, Ecogen, Madrid, España).

Tubos de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Alemania).



Tubos de 10 ml con anticoagulante, BD Vacutainer K2E (Becton Dickinson Systems, Plymouth, Reino Unido).

Tubos de 10 ml sin anticoagulante, BD Vacutainer Z (Becton Dickinson Systems, Plymouth, Reino Unido).

*UltraClean<sup>TM</sup> DNA BloodSpin<sup>TM</sup> kit* (Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, California, EE.UU.).

Ultracentrífuga *Mini Spin Plus* (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

## PROCESAMIENTO INICIAL DE MUESTRAS

La extracción de sangre periférica se realizó por punción en la vena cubital y se recogió en dos tubos de 10 ml, uno con EDTA como anticoagulante y otro sin anticoagulante. Transcurridos entre 60 y 120 minutos de la extracción, el tubo sin anticoagulante se centrifugó durante siete minutos a 2000 x g y Tª ambiente, en una centrífuga de sobremesa. Con cuidado de no arrastrar el sedimento, se recogió la muestra de suero. Seguidamente, tanto la muestra de sangre total como la de suero se distribuyeron en una alícuota de 200 µl y varias de 1000 µl en tubos de 1,5 ml, y se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Las muestras de LS y LCR se recogieron en tubos sin anticoagulante. Las biopsias de médula ósea y de válvula aórtica se obtuvieron inmediatamente después de la cirugía. Se lavaron en tampón fosfato salino y se congelaron en seco a -20°C hasta su procesamiento.

Todas las muestras fueron registradas, asignándoles un número de entrada, anotando la fecha de recogida, nombre y apellidos del paciente, número de historia clínica y servicio de procedencia.

## PROTOCOLOS DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO

### Hemocultivo, seroaglutinación y Coombs anti-*Brucella*

Los hemocultivos se procesaron en un sistema automático BacT/ALERT modelo 3D (Bio Mérieux Inc., Francia) de agitación y monitorización continua de los frascos BacT/ALERT FAN (Bio Mérieux Inc., Francia), previamente inoculados con 5 ml de

sangre del paciente. Este sistema utiliza un sensor colorimétrico y luz reflejada para detectar la presencia y producción de CO<sub>2</sub> disuelto en el medio de cultivo. Así, el sensor colorimétrico permeable al gas situado en el fondo de los frascos cambia de azul verdoso a amarillo. El periodo de incubación se prolongó hasta 10 días. Tras finalizar dicho periodo se realizó un subcultivo en agar sangre-chocolate durante 24h antes de descartar el hemocultivo como negativo.

La prueba de SAT y la prueba de Coombs anti-*Brucella* se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Otero y cols. (Otero *et al.*, 1982). Se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en U donde se realizaron diluciones dobles seriadas del suero problema, primero en suero salino y después en una suspensión de antígeno. Tras un periodo de incubación se observó la presencia o no de aglutinación. Los resultados positivos se expresaron en forma de títulos, considerando la reacción positiva hasta la dilución anterior a aquella en que apareció un botón de células sedimentadas en el fondo del pocillo, indicativo de que no se produjo reacción de aglutinación. Una vez anotados los resultados de la prueba de seroaglutinación, las placas se lavaron adecuadamente y se agregó globulina anti-IgG humana para detectar de esta forma la aglutinación mediada por los anticuerpos incompletos.

### **Rosa de Bengala**

Se utilizó una suspensión en tampón lactato de células completas de la cepa *B. abortus* 1119-3 teñida con el colorante Rosa de Bengala y ajustada a pH  $3,65 \pm 0,05$ , proporcionada por el Laboratorio Central de Veterinaria (Weybridge, Inglaterra). La prueba se realizó como se describe a continuación:

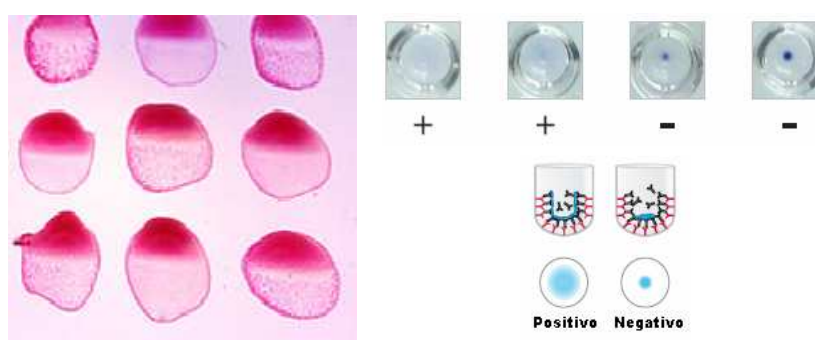
1. Dejar que la suspensión antigénica y las muestras de suero alcancen la T<sup>a</sup> ambiente.
2. Homogeneizar la suspensión antigénica mediante agitación suave.
3. Depositar sobre una baldosa blanca esmaltada 15 µl del suero problema y añadir 15 µl de la suspensión antigénica.
4. Efectuar la mezcla con ayuda de un palillo desechable.
5. Agitar la baldosa manualmente durante 4 minutos. Transcurrido este tiempo observar la presencia o no de aglutinación.

La presencia de aglutinación implica reacción positiva e indica la existencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp. (Figura 4). Una reacción negativa se observa como una suspensión uniforme y clara sin cambio visible alguno.

En cada ensayo de RB se incluyó un control positivo, que consistía en una muestra de suero de un paciente con brucelosis aguda, y un control negativo que consistía en una muestra de suero de un donante sano.

### Brucellacapt®

La prueba Brucellacapt® se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. En una placa con 12 tiras de ocho pocillos con fondo en U que contienen adsorbidos inmunoglobulinas antihumanas se añade el suero problema. Tras la dilución seriada de los sueros desde 1/40 hasta 1/5120 se añade el antígeno, una suspensión de *B. abortus* coloreada y muerta por calor y tratamiento con formaldehído al 0,5%. Las placas se sellan con papel adhesivo y se incuban durante 24 h a 37 °C en una cámara oscura y húmeda. Al igual que para la prueba de SAT o Coombs la lectura se realizó de forma visual y los resultados positivos se expresaron en forma de títulos, considerando la reacción positiva hasta la dilución anterior a aquella en que apareció un botón de células sedimentadas en el fondo del pocillo, indicativo de que no se produjo reacción de aglutinación (Figura 4).



**Figura 4.** Interpretación visual de los resultados de las pruebas Rosa de Bengala (izquierda) y Brucellacapt® (derecha).

## **Extracción del ADN**

La extracción del ADN de sangre, suero, LCR y LS se realizó a partir de 200 µl de muestra. Para ello se empleó el *kit* comercial *UltraClean™ DNA BloodSpin™*. En el caso de las muestras de médula ósea y válvula aórtica se utilizó el *kit QIAamp DNA Mini*. Las fases principales del protocolo de ambos *kits* consisten en: (i) la lisis celular y la desnaturalización de proteínas, (ii) la adsorción del ADN a una matriz sólida de sílice dispuesta en unos tubos provistos por el *kit*, (iii) el lavado del ADN unido a la matriz y, (iv) la liberación del ADN. Para ambos *kits* se siguieron las instrucciones del fabricante, con ligeras modificaciones que a continuación se indican entre paréntesis.

### **Protocolo de extracción de ADN (*UltraClean™ DNA BloodSpin™*):**

1. Añadir 20 µl (40 µl) de proteinasa K [6 mg/ml] a 200 µl de muestra contenida en un tubo de 1,5 ml.
2. Añadir 200 µl de tampón de lisis B1 (HCl guanidina/Tween), agitar la mezcla en un agitador durante 15 s e incubarla a 65° C durante 10 min (15 min).
3. Una vez completada la digestión, centrifugar el tubo durante unos segundos en una microcentrífuga para bajar las gotas condensadas por el calor. Seguidamente, añadir 200 µl de solución B2 (etanol 100%) y agitar de nuevo durante 15 s.
4. Pasar la mezcla a un tubo con filtro y centrifugar el tubo a 13000 x g y T<sup>a</sup> ambiente durante 1 min.
5. Transferir la columna a un tubo limpio, añadir 500 µl de tampón de lavado B3 (Etanol/HCl guanidina) sobre la columna y centrifugar a 13000 x g y T<sup>a</sup> ambiente durante 30 s.
6. Transferir de nuevo el filtro a un tubo limpio, añadir 500 µl de tampón de lavado B4 (Etanol/Tris/NaCl) y centrifugar a 13000 x g y T<sup>a</sup> ambiente durante 30 s. Repetir este paso sin añadir tampón de lavado.
7. Añadir sobre la columna 200 µl (50 µl para las muestras de sangre y 40 µl para las muestras de suero, LCR o LS) de tampón de elución B5 (10mM Tris) para liberar el ADN adsorbido al filtro. Para incrementar la cantidad de ADN

recuperado, incubar previamente el tubo en un bloque termostático a 65° C durante 5 min.

8. Finalmente, centrifugar el tubo a 13000 x g durante 1 min.
9. Desechar la columna y guardar el ADN obtenido a 4° C hasta su procesamiento.

**Protocolo de extracción de ADN (*QIAamp DNA Mini kit*):**

1. Pesar aproximadamente 25 mg de tejido, trocear y mezclar con 180 µl de tampón ATL en un tubo de 1,5 ml.
2. Añadir 20 µl de proteinasa K, agitar la mezcla en un agitador durante 15 s e incubarla en un bloque termostático a 56° C durante 1 hora.
3. Centrifugar los tubos ligeramente en una microcentrífuga para bajar las gotas del tapón.
4. Añadir 200 µl del tampón AL a la mezcla y agitarla en un agitador durante 15 s.
5. Incubar la mezcla en un bloque termostático a 70° C durante 10 min.
6. Centrifugar los tubos ligeramente en una microcentrífuga para bajar las gotas del tapón.
7. Añadir 200 µl de etanol (96-100%) y agitar la mezcla en un agitador durante 15 s.
8. Centrifugar los tubos ligeramente en una microcentrífuga para bajar las gotas del tapón.
9. Aplicar la mezcla a un tubo con filtro y centrifugarlo a 6000 x g durante 1 min. Cuidadosamente retirar el filtro y transferir a un tubo nuevo sin tocar el eluido.
10. Añadir 500 µl del tampón AW1 al filtro. Centrifugar a 6000 x g durante 1 min.
11. Cuidadosamente retirar el filtro y transferir a un tubo nuevo sin tocar el eluido.
12. Añadir 500 µl del tampón AW2 al filtro. 15. Centrifugar a 20000 x g durante 3 min.
13. Cuidadosamente retirar el filtro y transferir a un tubo nuevo sin tocar el eluido. Centrifugar a 20000 x g durante 1 min.
14. Retirar el filtro y transferirlo a un tubo nuevo. Añadir 200 µl (100 µl) del tampón AE. Para aumentar el rendimiento previamente incubar el tubo durante 1 min. (5 min.) a T<sup>a</sup> ambiente (65 °C).
15. Centrifugar el tubo a 6000 x g durante 1 min.

La concentración de ADN y su pureza se determinó en el espectrofotómetro *Nanodrop*<sup>®</sup>. El volumen de muestra de ADN empleado para la medición fue de 2 µl.

### Ensayo de PCRQtr

El termociclador utilizado en este estudio ha sido el *LightCycler* 1.5 de Roche.

### Cebadores y sonda *TaqMan*

Tanto los cebadores como la sonda fueron diseñados por nuestro grupo para un estudio anterior (Navarro *et al.*, 2006). Los cebadores utilizados amplifican un fragmento de 251 pb del genoma de *B. melitensis* que comprende parte del elemento de inserción IS711 y una región no codificante, con número de acceso AE00555 en la base de datos del GenBank.

En la Tabla 6 se muestra la secuencia y otras características de interés de los cebadores y la sonda *TaqMan* utilizados.

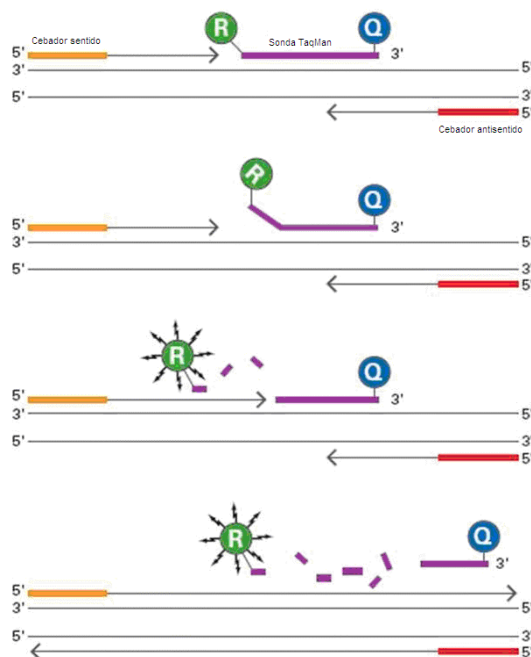
**Tabla 6.** Características de los cebadores y de la sonda *TaqMan*.

Nombre asignado	Tamaño (pb)	%GC	Tm (°C)	Secuencia
EFQ1	22	41	54	5'-TGTTTCGGCTCAGAATAATCCA-3'
ERQ2	22	50	54	5'-GCATGCGCTATGATCTGGTTAC-3'
StqME	26	54	65	5'-XATAGCTTACCCGCCAATCTTCGCCCTY-3'

EFQ1: cebador sentido; ERQ2: cebador anti-sentido; StqME: Sonda *TaqMan*; X: 6-carboxi-fluoresceína (FAM); Y: 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA).

La sonda de hidrólisis o tipo *TaqMan* empleada es un oligonucleótido de 26 pb diseñado para que hibride con una región interna de la secuencia diana entre los dos cebadores (Figura 5). Esta sonda está marcada con un fluoróforo donador o *reporter* en el extremo 5' y un fluoróforo receptor o *quencher* en el extremo 3'. Cuando el fluoróforo donador es excitado emite fluorescencia que es absorbida por el fluoróforo aceptor en un proceso de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Para que esto ocurra la sonda unida al fragmento diana ha de estar intacta, es decir, las moléculas donadora y aceptora deben estar próximas en el espacio. Además,

el espectro de emisión de la primera ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Cuando la enzima ADN *Taq* polimerasa comienza a copiar el ADN diana, gracias a su actividad 5'-3' exonucleasa la sonda es degradada. Este proceso libera el fluoróforo donador al medio de reacción separándolo del receptor, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia detectada por el fluorímetro del termociclador.



**Figura 5. Esquema del funcionamiento de la sonda TaqMan.** R: fluoróforo donador o *reporter*; Q: fluoróforo receptor o *quencher*.

La especificidad teórica de los cebadores y de la sonda TaqMan para *B. melitensis* fue determinada por nuestro grupo por comparación de las secuencias en la base de datos GenBank usando el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Navarro *et al.*, 2006). La especificidad real del ensayo de PCRQtr se evaluó analizando ADN de 21 cepas pertenecientes a seis especies diferentes del género *Brucella*, ocho cepas diferentes relacionadas filogenéticamente con *Brucella* spp. y cinco bacterias Gram negativas que muestran reacción cruzada serológica con *Brucella* spp. (Tabla 7). La especificidad fue del 100% para las biovariedades 1, 2 y 3 de *B. melitensis* según se muestra en la Tabla 7.

La sensibilidad analítica del ensayo de PCRQtr fue de 15 fg de ADN de *B. melitensis*, equivalente a 1 copia del ADN de la bacteria (Navarro *et al.*, 2006).

**Tabla 7.** Especies de *Brucella* y bacterias relacionadas genéticamente testadas.

Especies bacterianas	Cepas	Resultado PCRQtr
<i>B. melitensis</i> , bv 1	16M, Rev 1	Positivo
<i>B. melitensis</i> , bv 2	63/9	Positivo
<i>B. melitensis</i> , bv 3	Ether	Positivo
<i>B. abortus</i> , bv 1	RB51, 544 y S19	Negativo
<i>B. abortus</i> , bv 2	86/8/59	Negativo
<i>B. abortus</i> , bv 3	Tulya	Negativo
<i>B. abortus</i> , bv 4	192	Negativo
<i>B. abortus</i> , bv 5	B3196	Negativo
<i>B. abortus</i> , bv 6	870	Negativo
<i>B. abortus</i> , bv 9	C/68	Negativo
<i>B. suis</i> , bv 1	1330	Negativo
<i>B. suis</i> , bv 2	Thomsen	Negativo
<i>B. suis</i> , bv 3	686	Negativo
<i>B. suis</i> , bv 4	40	Negativo
<i>B. suis</i> , bv 5	513	Negativo
<i>B. neotomae</i>	5K33	Negativo
<i>B. ovis</i>	Reo198	Negativo
<i>B. canis</i>	RM6/66	Negativo
<b>Bacterias relacionadas genéticamente</b>		
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		Negativo
<i>A. tumefaciens</i>		Negativo
<i>A. vitis</i>		Negativo
<i>Ochobractum intermedium</i>	3301	Negativo
<i>O. anthropi</i>		Negativo
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>		Negativo
<i>P. rubiacearum</i>		Negativo
<i>Vibrio cholerae</i>		Negativo
<b>Bacterias relacionadas serológicamente</b>		
<i>Escherichia coli</i>		Negativo
<i>Franciscella tularensis</i>		Negativo
<i>Pasteurella multocida</i>		Negativo
<i>Salmonella urbana</i>		Negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>		Negativo

Bv, biovar.

Navarro *et al.*, 2006.



### ***Mezcla de reacción***

La reacción del ensayo de PCRQtr se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo:

- 200 ng de ADN procedente de las muestras de sangre, o 2  $\mu$ l de ADN procedente de las muestras de suero, LCR o LS.
- 400 nM de cada cebador.
- 100 nM de sonda TaqMan.
- 6 mM de  $MgCl_2$ .
- 4  $\mu$ l de la mezcla del tampón que contiene la enzima ADN *Taq* polimerasa, tampón de reacción y una mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP).
- El volumen final se completó con agua ultrapura.

La mezcla de reacción se introdujo en los capilares previamente dispuestos en un bloque de refrigeración. Tras la adicción de la mezcla de reacción, los capilares se tsparon y se centrifugaron durante 10 s en una centrífuga de sobremesa.

En cada ensayo de PCRQtr se incluyó un control positivo, que consistía en  $10^3$  copias del fragmento de 251 pb específico para *B. melitensis*, y un control negativo que contenía todos los componentes de la reacción excepto el ADN que se sustituyó por un volumen equivalente de agua ultrapura. Las muestras de los sujetos se analizaron por triplicado. Una muestra se consideró positiva cuando hubo amplificación de la secuencia diana en al menos una de las tres réplicas.

### ***Condiciones de amplificación***

La amplificación del ADN mediante la PCR cualitativa, y por extensión la PCRtr, sigue una progresión geométrica de forma que al final de “n” ciclos de amplificación se obtienen  $2^n$  copias del ADN inicial hasta el momento en que se alcanza la fase meseta, por agotamiento de los componentes de la reacción.

Las condiciones de amplificación del ensayo de PCRQtr empleado fueron las siguientes:

1. Un ciclo a 95 °C durante 600 s, para la activación de la enzima ADN *Taq* polimerasa.
2. 45 ciclos de:
  - Desnaturalización del ADN molde a 95 °C durante 10 s.
  - Hibridación de los cebadores y la sonda a la secuencia diana a 60 °C durante 15 s.
  - Extensión de la hebra complementaria por el enzima ADN polimerasa a 72 °C durante 15 s.
3. Un ciclo de enfriamiento del sistema a 40 °C durante 30 s.

### ***Cuantificación absoluta***

Los resultados de cada experimento se analizaron usando la versión 3.5 del programa informático del termociclador. Para cada muestra, el programa informático calcula el número del ciclo en el que el fluorímetro empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la fluorescencia basal. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (*Crossing point* o *Cp*) o ciclo umbral (*threshold cycle* o *Ct*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Interpolando en una curva estándar los valores de los *Ct* de cada muestra problema se puede inferir su concentración de ADN inicial.

Para calcular el valor del *Ct* se usó el algoritmo de la segunda derivada. La medida de la fluorescencia se realizó al final de cada ciclo usando el filtro F1/F2. Se consideraron valores negativos o ausencia de amplificación cuando el valor del *Ct* fue superior a 45. Los resultados positivos se confirmaron por inspección visual de las gráficas de amplificación en la pantalla de un monitor.

### ***Curva externa estándar***

### **Obtención de la secuencia diana**

La secuencia de ADN de 251 pb de *B. melitensis* que teníamos clonado en un plásmido (*pGEM-T Easy Vector Systems*) se amplificó mediante el ensayo PCRQtr. Con el objetivo de identificar la secuencia deseada en función de su tamaño y así separarla de otros productos de amplificación inespecíficos, el amplificado se corrió en un gel de agarosa al 1%. A continuación se describe el protocolo.

#### **Protocolo de preparación de un gel de agarosa al 1%:**

1. Pesar 0,6 g de agarosa en un matraz y disolver con 60 ml de tampón TBE 0,5 % mediante calentamiento hasta ebullición en un microondas.
2. Dejar enfriar hasta aproximadamente 50 °C y añadir 4,5 µl de bromuro de etidio.
3. Verter la mezcla en un portageles previamente sellado y colocar un peine.
4. Una vez solidificado el gel, retirar el peine e introducir el portageles en una cubeta de electroforesis que contiene tampón de electroforesis TBE 0,5%.
5. Los productos de PCRQtr se mezclan con una tercera parte de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25%, sacarosa 40% y agua destilada).
6. En cada pocillo, cargar 5 µl de la mezcla anterior (producto de PCRQtr más tampón de carga). Cargar 4 µl de marcador de peso molecular.
7. Conectar la cubeta a una fuente de electroforesis y dejar correr a 95 mV durante 20 min.
8. Colocar el gel en un transiluminador de luz ultravioleta para la visualización de las muestras.

La banda del gel correspondiente a la secuencia diana se cortó con ayuda de un bisturí. Para purificarla y separarla de sales, enzimas, nucleótidos, cebadores y otros componentes se utilizó el *kit DNA Gel Extraction Montáge* siguiendo las instrucciones del fabricante como se describe a continuación.

**Protocolo de purificación del ADN (*DNA Gel Extraction Montaje*):**

1. Localizar la banda de interés en el gel utilizando un transiluminador de luz ultravioleta y cortarla con ayuda de un bisturí.
2. Introducir el trozo de gel cuyo volumen no debe ser superior a 100 µl sobre el filtro contenido en uno de los tubos proporcionados por el *kit*.
3. Centrifugar el tubo a 5000 x g durante 10 min en una ultracentrífuga.
4. Deshechar el filtro y obtener el ADN eluido.

Una vez purificado el ADN, determinamos su concentración (ng/µl) en el espectrofotómetro. Para determinar el número de moléculas de la secuencia diana realizamos los siguientes pasos:

1. Determinamos el peso molecular (Pm) de la secuencia de interés según la fórmula:

$$Pm = (A \times 312,2) + (G \times 328,2) + (C \times 288,2) + (T \times 303,2) - 61$$

Donde:      A= es igual al n° total de nucleótidos adenina  
                G= guanina  
                C= citosina y  
                T= timina

2. Determinamos el número de moles de la secuencia diana mediante la siguiente fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de moles} = X/Pm$$

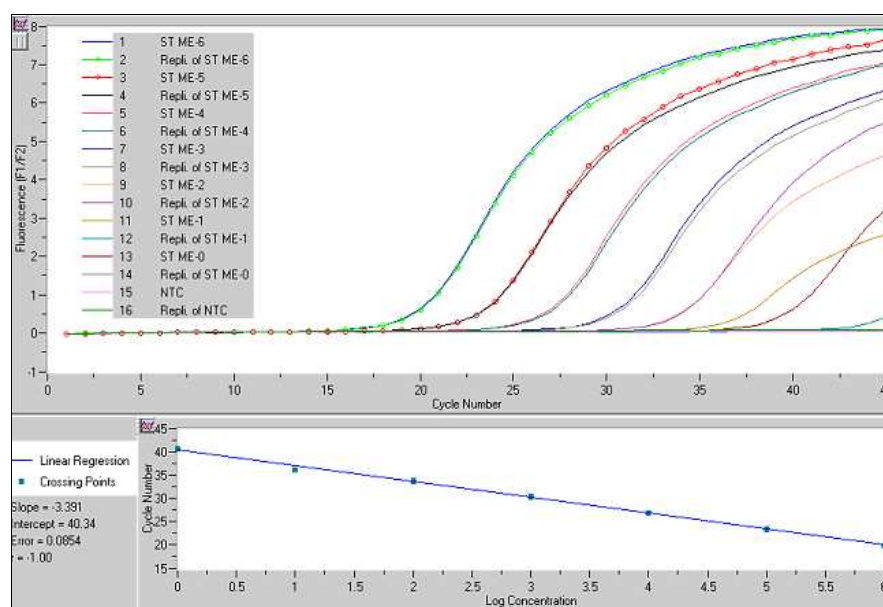
Donde: X= cantidad total de ADN (concentración de ADN (ng/µl) multiplicado por el volumen de ADN eluido (µl))

3. Por último, determinamos el n° de moléculas multiplicando el n° de moles por el N° de Avogadro ( $6,022 \times 10^{23}$  moléculas/mol).

## Amplificación de los estándares

La amplificación por duplicado de siete diluciones seriadas del fragmento amplificado de 251 pb de *B. melitensis* reveló un rango de detección lineal de  $10^6$  a 1 copias por mezcla de reacción (Figura 6). La correlación del valor de Ct y el nº de copias del fragmento fue  $Ct = -3,39 \times \log(\text{copias}) + 40$ ; con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 1, una pendiente de -3,4 y una eficiencia ( $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ ) de 1,97 (Figura 6).

Estos parámetros indican que la cuantificación de las copias del fragmento de *B. melitensis* es fiable. El límite inferior de detección fue de 1 copias de amplicón de *B. melitensis*. En el ensayo se incluyó un control negativo de la PCRQtr que contenía todos los reactivos, excepto el ADN que se sustituyó por agua ultrapura.



**Figura 6. Curva externa estándar.** Curvas de amplificación del fragmento de 251 pb de *B. melitensis* desde  $10^6$  a 1 copias (imagen superior). Regresión lineal de Ct vs log del nº de copias del fragmento de 251 pb de *B. melitensis* (imagen inferior); NTC: control negativo.

## Precauciones en el control de las contaminaciones

Dada la gran sensibilidad del ensayo de PCRQtr para amplificar pequeñas cantidades de ADN, es importante evitar contaminaciones con ADN exógeno y, sobre todo, con productos de amplificación previos.

Para extremar las precauciones dividimos el laboratorio en dos espacios físicos separados, un área de pre-amplificación y un área de post-amplificación. La mezcla de reacción se preparó en una cabina de flujo laminar provista de un sistema de luz ultravioleta situada en el área de pre-amplificación. Antes de proceder a la preparación de cada ensayo de PCRQtr, el juego de micropipetas y las pinzas metálicas se pulverizaron con *DNA Remove*<sup>®</sup>, una solución de detergentes formulada para eliminar el ADN o ARN de superficies de trabajo y material de laboratorio que se mantuvo durante 10 min. Después, éste y otro material (tubos de 1,5 ml, capilares, puntas con filtro y alícuotas de agua estéril y MgCl<sub>2</sub>), de uso exclusivo para el ensayo de PCRQtr, se esterilizó en la cabina con luz ultravioleta durante 15 min según las indicaciones descritas por Queipo-Ortuño en su tesis doctoral (Queipo-Ortuño, 1998). Por último, la adicción del control positivo o estándar se realizó en el área de post-amplificación.

Otra medida adoptada para detectar posibles contaminaciones de las muestras con productos de amplificación previos fue la colocación de un tubo con agua ultrapura entre los tubos que contenían las muestras clínicas que se iban a procesar para la extracción del ADN. El tubo con agua ultrapura se manipuló como si de una muestra más se tratara y se analizó posteriormente mediante el ensayo de PCRQtr. En dos ocasiones que se amplificó ADN de *B. melitensis* en el tubo con agua ultrapura, se repitió la extracción de ADN de las muestras.

## **RECOGIDA DE DATOS**

La recogida de los datos clínicos y resultados del hemocultivo, SAT y Coombs se realizó a partir de la historia clínica del sujeto.

### **Variables de estudio**

Para el manejo de los datos clínicos y los resultados obtenidos en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación del CHUA se utilizó una hoja de cálculo, donde se introdujeron las variables referentes a:

- Características sociodemográficas: edad (en años), sexo (varón o mujer) y tipo de hábitat (rural o urbano).

- Características clínicas: presencia o ausencia de síntomas, enfermedades asociadas y/o enfermedad focal; tipo y duración en días del tratamiento antimicrobiano.
- Aspectos epidemiológicos: tiempo transcurrido en años desde el último episodio de brucelosis aguda del sujeto hasta su entrada en el estudio, y la presencia o ausencia de factores de riesgo durante la realización del mismo.
- Resultados de las pruebas de laboratorio: presencia o ausencia de hemocultivo positivo, presencia o ausencia de RB positivo, título recíproco detectado mediante las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt® y la carga bacteriana cuantificada (nº de copias de ADN de *B. melitensis* por mililitro de sangre o suero).
- Días de seguimiento del sujeto desde su entrada en el estudio.
- Cuando estuvieron disponibles, se registraron los resultados del hemograma y la bioquímica sanguínea.

Para describir la evolución de la carga bacteriana con el tratamiento antimicrobiano, las muestras se agruparon en tres periodos (basal, tratamiento y seguimiento) según se hubieran recogido antes, durante o después de finalizar el mismo.

### **Cálculo de la carga bacteriana**

El número de copias de ADN de *B. melitensis* por mililitro de sangre o suero se resume a lo largo de esta memoria como carga bacteriana.

Para su cálculo se siguió la siguiente fórmula:

$$[\sum n_x / \sum v_x] \times v_E \times [1000/V_M]$$

Donde:

$n_x$ : suma del nº de copias cuantificadas en cada réplica  
 $v_x$ : suma del volumen en µl de ADN añadido en cada réplica  
 $v_E$ : volumen eluido en µl en la extracción de ADN  
 $v_M$ : volumen en µl de muestra de partida

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando los programas *SPSS*<sup>®</sup> (versión 14.0; SPSS Inc., Chicago, Illinois, EEUU) y *MedCalc*<sup>®</sup> (versión 11.2.1.0; MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica). El nivel de significación estadística se estableció al 5% ( $p < 0,05$ ).

### Descripción de las variables de estudio

Las variables cualitativas se describen mediante su frecuencia absoluta y porcentaje. Las variables cuantitativas continuas se resumen en su media, desviación estándar (DE) y el rango de valores mínimo y máximo. Cuando su distribución se apartaba de la normalidad se calculó además la mediana y el rango intercuartílico (p25-p75). Los datos fueron sintetizados mediante la oportuna tabulación y representados gráficamente.

Los criterios de normalidad de las variables se comprobaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Shapiro-Wilk cuando el tamaño muestral fue inferior a 50). Si las variables no cumplían los criterios de normalidad, se usó la transformación logarítmica de los datos.

### Estudio de la relación o asociación entre variables

Para estudiar la asociación o relación entre dos variables cualitativas independientes se utilizó la prueba de chi-cuadrado con corrección de Yates, y la prueba exacta de Fisher cuando el valor esperado del 25% de las casillas era menor o igual a 5. Si las variables eran cualitativas apareadas se empleó la prueba de McNemar.

Para estudiar la asociación o relación entre dos variables cuantitativas independientes se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para analizar la relación entre dos variables cuantitativas relacionadas se utilizó la prueba t de Student como prueba paramétrica y la prueba de Wilcoxon como no paramétrica.



En el caso de una variable cuantitativa y otra con más de dos categorías, se aplicó la prueba de Análisis de Varianza como prueba paramétrica y la prueba H de Kruskal-Wallis como no paramétrica.

### **Estudio de la concordancia entre el ensayo de PCRQtr en sangre y suero**

Cualquier comparación entre dos series de mediciones es susceptible de ser evaluada en términos de concordancia entre las series, es decir, verificar si ambas concuerdan o no y en qué grado. Para medir el grado de acuerdo entre el ensayo de PCRQtr en sangre y en suero se calculó la proporción de coincidencias frente al total de muestras analizadas. Con el fin de determinar hasta qué punto la concordancia observada era superior a la que es esperable obtener por puro azar, se calculó el índice de concordancia kappa. El coeficiente kappa fue propuesto originalmente por Cohen en 1960 para el caso de dos evaluadores o dos métodos (Molinero LM, 2001). Landis y Koch propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa (Tabla 8).

**Tabla 8.** Grado de acuerdo en función del índice kappa (Landis y Koch, 1977)

<b>kappa</b>	<b>Grado de acuerdo</b>
< 0	Sin acuerdo
0 – 0,2	Insignificante
0,2 – 0,4	Bajo
0,4 – 0,6	Moderado
0,6 – 0,8	Bueno
0,8 - 1	Muy bueno

### **Valoración de la capacidad diagnóstica del ensayo de PCRQtr y las pruebas serológicas**

Se valoró la capacidad diagnóstica del ensayo de PCRQtr y de las pruebas serológicas RB, SAT, Coombs y Brucellacapt®. La prueba diagnóstica más simple es aquella que en función de que el resultado sea negativo o positivo clasifica a los sujetos como sanos o enfermos. Las pruebas cuyo resultado es una variable cuantitativa se valoraron como dicotómicas. En el caso del ensayo de PCRQtr se estableció la

presencia o ausencia de ADN de *B. melitensis*. En el caso de las pruebas serológicas se consideró el punto de corte establecido en la literatura para el diagnóstico de la brucelosis. Es decir, se tomó como valor positivo un título mayor o igual a 1/160 para la prueba de SAT y un título mayor o igual a 1/320 para la prueba de Coombs y la prueba de Brucellacapt®.

Una forma de cuantificar la capacidad diagnóstica de una prueba es mediante el cálculo de la sensibilidad y especificidad. La sensibilidad (S) es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por tanto, la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad. La especificidad (E) es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga en la prueba un resultado negativo. Ambos índices responden a las fórmulas presentadas en la Tabla 9 en la que se enfrenta el resultado de la prueba diagnóstica (en filas) con el estado real de los pacientes (en columnas) o el resultado de una prueba de referencia o estándar de oro. Los resultados de estas fórmulas se expresan en tantos por cien.

**Tabla 9.** Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.

		Verdadero diagnóstico		
		Enfermo	Sano	
Resultado de la prueba	Positivo	Vp	Fp	Total positivos
	Negativo	Fn	Vn	Total negativo
		Total enfermos	Total sanos	

vp: verdaderos positivos; fp: falsos positivos; fn: falsos negativos; vn: verdaderos negativos; Sensibilidad:  $vp/(vp + fn)$ ; Especificidad:  $vn/(vn + fp)$ .

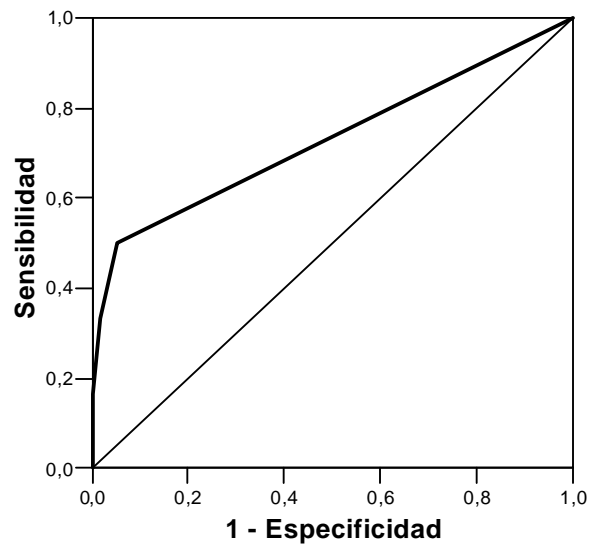
En la práctica clínica es importante conocer si una prueba es apta predecir la enfermedad, es decir, para determinar la proporción de pacientes con una prueba positiva que son verdaderos enfermos (Bland y Altman, 1994). Para ello, calculamos el cociente de probabilidad positivo (CP+) o cociente de verosimilitud positivo (de la terminología inglesa, *likelihood ratio of positive test*) y el cociente de probabilidad negativo (CP-) o cociente de verosimilitud negativo (de la terminología inglesa,

*likelihood ratio of negative test*) El CP ofrece la ventaja de que relaciona la S y la E de una prueba en un solo índice. Al igual que sucede con la S y la E, no varía con la prevalencia de la enfermedad en la población, lo cual permite utilizarlo como índice de comparación entre distintas pruebas para un mismo diagnóstico.

El CP+ se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado positivo en los individuos enfermos entre la probabilidad de un resultado positivo en los sujetos sanos. Es el cociente entre la fracción de verdaderos positivos (S) y la fracción de falsos positivos (1-E). El CP- es la razón entre la probabilidad de un resultado negativo en presencia de enfermedad y la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de la misma. Se calcula dividiendo el cociente entre la fracción de falsos negativos (1-S) y la fracción de verdaderos negativos (E). Así, valores mayores de CP+ indican mejor capacidad para diagnosticar la presencia de enfermedad. De la misma forma, valores menores de CP- indican una mejor capacidad diagnóstica de la prueba.

En el caso de las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup> se definieron también los valores de corte que permiten una clasificación dicotómica de los resultados de la prueba según sean superiores o inferiores al valor elegido. Este análisis se llevó a cabo mediante el análisis de las curvas COR (Características Operativas del Receptor) o ROC (*Receiver Operating Characteristics*). Una curva ROC representa gráficamente la proporción de falsos positivos (1- E) en el eje X frente a la proporción de verdaderos positivos (S) en el eje Y para todos los posibles valores de corte de la prueba (Figura 7). A medida que se cambia el punto de corte, se obtienen parejas de valores de S y E que se representan como puntos. La unión de esos puntos es la curva ROC. Cuanto más se aleja la curva ROC de la diagonal mejor es el rendimiento de la prueba diagnóstica. Una manera de evaluar ese alejamiento es mediante el área bajo la curva (ABC) que representa la probabilidad de que un sujeto enfermo tenga un valor más anormal que un sujeto sano, en este caso, que un sujeto con brucelosis crónica tenga un valor de anticuerpos más alto que uno sano. Como los ejes X e Y van de 0 a 1, el área está comprendida entre 0,5 y 1. Cuando una prueba no es capaz de distinguir entre sujetos enfermos y sanos, el ABC es igual a 0,5. Se considera que los valores comprendidos entre 0,5 y 0,7 indican baja exactitud, entre 0,7 y 0,9 pueden ser útiles para algunos propósitos y un valor mayor de 0,9 indica exactitud alta (Swets, 1986). El punto de

corte óptimo, desde el punto de vista estadístico, viene dado por la combinación de máxima S y E, y es el que tiene como coordenadas al punto en el que la curva se aleja más de la diagonal.



**Figura 7. Curva COR.**

**RESULTADOS**

---



## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DE LABORATORIO DE LOS SUJETOS

### Grupo control

De los 38 sujetos incluidos en el grupo control, 20 eran varones (53%) y 18 mujeres (47%) con edades comprendidas entre los 20 y los 82 años (media  $\pm$  DE: 46  $\pm$  18 años). El 40% de los sujetos procedía del medio rural y el 60% del medio urbano.

Inicialmente se obtuvo una muestra de sangre y suero por sujeto hasta un total de 76 muestras, 38 de sangre y 38 de suero. Las pruebas serológicas convencionales (RB, SAT y Coombs) resultaron negativas en todos los casos analizados. Sin embargo, la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> fue positiva en cinco sujetos (13%), un donante sano, un sujeto sano expuesto a *Brucella* spp., un paciente con bacteremia por *Staphylococcus hominis*, un paciente con bacteremia por *Escherichia coli* y un paciente con bacteremia por *Streptococcus pneumoniae*. En estos sujetos, los títulos de anticuerpos detectados fueron de 1/80 en el sujeto sano expuesto a *Brucella* spp. y de 1/40 en el resto.

Respecto al ensayo de PCRQtr, las muestras de todos los sujetos excepto uno (el paciente con bacteremia por *S. pneumoniae*) fueron negativas. El amplificado de este paciente se envió a secuenciar y se encontró una homología de más del 99% con *B. melitensis*. Este paciente se siguió durante siete meses, periodo en el que se analizaron cuatro muestras más de sangre y suero mediante el ensayo de PCRQtr, de las cuales una muestra de suero fue de nuevo positiva.

### Grupo de estudio

Inicialmente se evaluaron 46 sujetos con antecedentes de brucelosis de los cuales ocho no pudieron incluirse en el estudio. En la Tabla 10 se resumen las características demográficas, clínicas y los resultados de las pruebas de laboratorio de los ocho sujetos excluidos del estudio. El motivo de exclusión en los cinco primeros sujetos fue que el episodio de brucelosis aguda no estaba bien documentado. Los tres sujetos restantes cambiaron de ciudad o país y no se les pudo hacer un seguimiento clínico.

**Tabla 10.** Características demográficas, clínicas y resultados del ensayo de PCRQtr y de las pruebas serológicas convencionales de los ocho sujetos excluidos del estudio.

Nº pct.	Edad/ Sexo	Factor de riesgo	Clínica	RB	SAT <sup>a</sup>	Coombs <sup>a</sup>	PCRQtr	
							Sangre	Suero
1	53/M	Enfermera, hermano con brucelosis	Fibromialgia, depresión	-	-	-	+	+
2	54/M	Auxiliar de clínica	Fibromialgia, dolor lumbosacro	+	40	40	+	+
3	60/V	Ganadero	Poliartralgias, serología positiva para <i>Coxiella burnetii</i> y <i>Borrelia burgdorferi</i>	-	-	-	-	-
4	44/V	c.c.g, c.d.p.l.s.p.	Mielitis cervical C4	+	20	640	+	+
5	71/M	c.d.p.l.s.p.	Escalofríos, sudoración vespertina, náuseas de un año de evolución	-	-	-	+	+
6	66/V	c.d.p.l.s.p., vive en México	Artritis reumatoide seropositiva en tratamiento con cloroquina	+	40	80	-	-
7	56/V	Veterinario, vive en Córdoba	Síndrome de fatiga crónica	+	20	320	-	-
8	21/V	Granjero	Miopericarditis	+	40	320	+	+

Nº pct: número de paciente; RB, Rosa de Bengala; SAT: seroaglutinación en tubo; V: varón; M: mujer; CG: contacto con ganado; c.d.p.l.s.p.: consumo de productos lácteos sin pasteurizar; -: negativo; +: positivo; <sup>a</sup> títulos recíprocos.

El grupo de estudio quedó compuesto por 38 sujetos con una historia bien documentada de brucelosis, diagnosticada entre tres y 33 años antes de su inclusión en el estudio ( $11 \pm 6$  años). Veintisiete eran varones (71%) y 11 mujeres (29%), con edades comprendidas entre los 26 y los 83 años ( $49 \pm 14$  años). Veintitres sujetos procedía del medio rural (60%), el resto del medio urbano. El periodo de seguimiento durante la realización del estudio osciló entre los 113 y los 1638 días ( $726 \pm 440$  días).



Atendiendo a la evolución clínica, los sujetos se clasificaron en tres grupos:

- Grupo A: 10 sujetos que habían tenido o tenían enfermedad focal.
- Grupo B: 8 sujetos que presentaban síntomas inespecíficos.
- Grupo C: 20 sujetos asintomáticos.

Se obtuvieron entre 3 y 30 muestras de sangre y suero por sujeto ( $9 \pm 7$  muestras) hasta un total de 694 muestras, 346 de sangre, 344 de suero, una muestra de LCR, una muestra de LS, una muestra de médula ósea y una muestra de válvula aórtica.

En el Anexo se recoge una descripción detallada de la historia clínica, de las pruebas diagnósticas realizadas y la evolución de cada uno de estos sujetos durante la realización del estudio. A continuación se describe de forma pormenorizada cada grupo.

#### ***Grupo A: pacientes con enfermedad focal***

De los 10 pacientes con enfermedad focal, ocho eran varones y dos mujeres, con edades comprendidas entre los 30 y los 81 años ( $53 \pm 16$  años). El 70% procedía del medio rural, el resto del medio urbano. El tiempo transcurrido desde el último episodio de brucelosis aguda hasta la inclusión en el estudio osciló entre los cuatro y los 27 años ( $10 \pm 7$  años).

#### **Características del episodio agudo**

Los antecedentes epidemiológicos de los pacientes con enfermedad focal se muestran en la Tabla 11. El mecanismo más frecuente de adquisición de la primoinfección fue el contacto directo con ganado ovino o caprino, que se presentó en el 60% de los casos, si bien en tres casos (nº 6, 7 y 8), este contacto fue puntual. El resto de pacientes contrajo la enfermedad por consumo de productos lácteos sin pasteurizar. Factores de riesgo que en cualquier caso no estuvieron presentes durante la realización de este estudio.

**Tabla 11.** Antecedentes epidemiológicos de los pacientes con enfermedad focal (grupo A).

Nº pct.	Año del último episodio de brucelosis aguda	Factor de riesgo	Profesión
1	1998	c.d.p.l.s.p., hábitat rural	Agricultor
2	1978	c.d.p.l.s.p., c.c.p.a.	Matarife
3	2000	hábitat rural	Camionero
4	2002	c.c.g., hábitat rural	Pastor
5	1990	c.c.g.	Veterinario
6	1998	c.c.g., hábitat rural	Estudiante
7	1999	c.c.g., hábitat rural	Construcción
8	2000	c.c.g., hábitat rural	ND
9	1993	c.c.g., inyección accidental con la cepa vacunal <i>B. melitensis</i> Rev-1	Veterinaria
10	1995	c.d.p.l.s.p., hábitat rural	Ama de casa

Nº pct.: número de paciente; c.d.p.l.s.p.: consumo de productos lácteos sin pasteurizar; c.c.p.a.: contacto con productos animales; c.c.g.: contacto con ganado caprino u ovino; ND: no hay datos.

En la mayoría de los casos (80%), el episodio agudo se diagnosticó mediante serología para *Brucella* spp. (SAT  $\geq 1/160$  o Coombs  $\geq 1/320$ ) junto con clínica compatible con brucelosis. En los dos restantes pacientes, el diagnóstico se realizó por aislamiento de *Brucella* spp. en cultivo; a partir de una biopsia de ganglio linfático compatible con una adenitis granulomatosa abscesificada en el paciente nº 4 y de una muestra de sangre en el nº 7. Éstos y tres pacientes más, (nº 3, 6 y 8), fueron diagnosticados de una complicación de la enfermedad que serán descritas en siguientes apartados. A excepción del paciente nº 2 que no recibió tratamiento antimicrobiano en el episodio agudo, todos fueron tratados con doxiciclina sólo o en combinación con gentamicina, rifampicina o estreptomycin.

### Características clínicas

Al inicio del estudio, todos los pacientes excepto dos (nº 3 y 8), presentaron síntomas propios de la enfermedad focal o de la enfermedad asociada. En la Tabla 12 se muestran las características demográficas y clínicas de este grupo.

**Tabla 12.** Características demográficas y clínicas de los pacientes con enfermedad focal (grupo A).

Nº pct.	Edad/ Sexo	Enfermedad focal	Enfermedad asociada	Clínica
1	66/V	Absceso esplénico	DM II, portador de prótesis en cadera izquierda	Poliartralgia
2	51/V	Coxitis derecha	HTA, dislipemia, depresión, glaucoma	Dolor en cadera derecha
3	60/V	Absceso hepático*	Dislipemia, obesidad	Asintomático
4	54/V	Adenitis axilar derecha*	Esquizofrenia, gammapatía biclonal idiopática, bronquitis crónica	Dolor en hombro derecho
5	44/V	Neuropatía motora multifocal	HTA, prostatitis crónica, litiasis renal izquierda	Pérdida de fuerza mano derecha
6	30/V	Orquitis derecha*, artritis de rodilla derecha	Crisis epilépticas	Poliartralgia
7	35/V	Absceso sacroilíaco*, mielitis C5	Hemocromatosis, obesidad, dermatitis seborreica	Parestesia cara exterior muslo izquierdo
8	64/V	Espondilitis L1-D12*, absceso de psoas*	Obesidad, dislipemia	Asintomático
9	40/M	Espondilitis L5	Fibromialgia, asma, pustulosis palmoplantar	Artromialgia, dolor lumbar
10	81/M	Espondilitis L4-L5	Diabetes, tromboflebitis	Artromialgia, dolor lumbar

Nº pct.: número de paciente; V: varón; M: mujer; \*: complicación diagnosticada en el episodio agudo; DM II: diabetes mellitus tipo II; HTA: hipertensión arterial; C: cervical; D: dorsal; L: lumbar.

La afección focal más frecuente fue la osteoarticular, que se presentó en el 60% de los pacientes: tres espondilitis, una sacroileítis, una artritis de rodilla y una coxitis. Otras complicaciones de la enfermedad fueron un absceso esplénico, un absceso hepático, una adenitis axilar derecha, una orquitis, una mielitis y una neuropatía motora multifocal.

La enfermedad asociada más frecuente fue la obesidad que se presentó en tres pacientes (30%), seguida de las enfermedades cardiovasculares, cutáneas y respiratorias. Con menor frecuencia se dieron otras como enfermedad renal, diabetes mellitus, hemocromatosis, prostatitis crónica, esquizofrenia, depresión, crisis epilépticas y fibromialgia.

### Tratamiento antimicrobiano y analítica general

Durante la realización de este estudio, seis de los 10 pacientes (60%) con enfermedad focal recibieron tratamiento antimicrobiano entre 45 y 540 días ( $242 \pm 203$  días). Las pautas recibidas se muestran en la Tabla 13. La respuesta inicial al tratamiento fue satisfactoria en todos los casos. Sin embargo, tras finalizar el tratamiento, la mayoría de los pacientes aquejaban de la persistencia de los síntomas anteriormente descritos. En los pacientes nº 5 y 9, un nuevo ciclo del mismo tratamiento antimicrobiano, administrado a los tres y 16 meses de evolución, respectivamente, no modificó su sintomatología. Sólo dos pacientes, el nº 1, que recibió tratamiento de forma continuada durante 18 meses y el paciente nº 10, intervenido de una espondilitis lumbar, resolvieron los síntomas de forma definitiva.

**Tabla 13.** Tipo y duración del tratamiento de los pacientes con enfermedad focal (grupo A).

Nº pct.	Agente terapéutico (días)	Duración total en días	Evolución clínica
1	1: Dox. (60) + Estrep. (15) 2: Dox. (60) + Rif. (45) 3: Dox. (240) + Rif. (240) + TMP-SMZ (240) 4: Dox. (180)	540	Curación (asintomático)
2	1: Dox. (90) + Rif. (90)	90	Fallo terapéutico (dolor en cadera derecha)
5	1: Dox. (240) + Rif. (240) 2: Dox. (180) + Rif. (180)	420	Mejoría transitoria (pérdida de fuerza mano y pie derecho)
6	1: Dox. (45) + Gent. (7)	45	Desconocido
9	1: Dox. (90) + Rif. (90) 2: Dox. (90) + Rif. (90) 3: Dox. (90) + Rif. (90)	270	Mejoría transitoria (artromialgia, dolor lumbar)
10	1: Dox. + TMP-SMZ (90)	90	Curación (asintomático)

Nº pct.: número de paciente; Dox.: doxiciclina (100 mg/12 h); Estrep.: estreptomicina (1 g/24 h); Rif.: rifampicina (900 mg/24 h); TMP-SMZ: cotrimoxazol (TMP 160 mg/12 h y SMZ 800 mg/12 h); Gent.: gentamicina (240 mg/24 h).

La mayoría (60%) de los pacientes con enfermedad focal presentaron una analítica general normal. Sólo tres pacientes (nº 1, 5 y 10) presentaron una velocidad de sedimentación globular mayor de 50 mm a la 1ª h (valor normal entre 1 y 20 mm 1ª h). Dos de estos pacientes (nº 1 y 10) presentaron además un nivel de proteína C reactiva (pcr) superior a 50 mg/l (valor normal entre 0 y 5 mg/l). El paciente nº1 presentó también una elevación de la transaminasa GGT de hasta 269 u/l (valor normal entre 9 y 35 u/l), coincidiendo con la toxicidad por cotrimoxazol (TMP-SMZ) y una discreta elevación de las transaminasas AST o GOT (valor normal entre 5 y 31 u/l) y ALT o GPT (valor normal entre 5 y 31 u/l). El paciente nº 3 presentó además de una discreta elevación de las transaminasas, una elevación de la fosfatasa alcalina, con bilirrubina total menor de 2,0 mg/dl (valor normal entre 0,2 y 1,1 mg/dl). Este comportamiento conocido como patrón ocupacional hepático es típico de la granulomatosis hepática.

Otras pruebas complementarias como glucemia, ácido úrico, urea, creatinina, actividad de protrombina y orina elemental y sedimento fueron normales o presentaron anomalías esperables por otras enfermedades de los pacientes como es el caso de la diabetes mellitus.

#### Pruebas serológicas y ensayo de PCRQtr

En total se analizaron 284 muestras, 141 muestras de sangre, 140 muestras de suero, una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) del paciente nº5 con una neuropatía motora multifocal, una muestra de líquido sinovial (LS) del paciente nº6 con artritis de rodilla y una muestra de médula ósea del paciente nº 10 intervenido de una espondilitis.

##### *En la primera visita*

A la entrada en el estudio, todos los pacientes con enfermedad focal presentaron ADN de *B. melitensis* en sangre, suero u otro tipo de muestra biológica y anticuerpos anti-*Brucella* detectados mediante al menos una de las cuatro pruebas serológicas evaluadas. En la Tabla 14 se muestran los resultados de la serología y el nivel de ADN de *B. melitensis* cuantificado en la primera muestra que fue positiva para el ensayo de PCRQtr, que se corresponde en la mayoría de los casos con la primera visita. Sólo en un

paciente (nº 1), el ensayo de PCRQtr fue positivo con posterioridad, en la segunda visita.

**Tabla 14.** Resultado de las pruebas serológicas y del ensayo de PCRQtr de los pacientes con enfermedad focal (grupo A) a la entrada en el estudio.

Nº pct.	RB	SAT <sup>a</sup>	Coombs <sup>a</sup>	Brucellacapt <sup>®a</sup>	PCRQtr <sup>b</sup>	
					Sangre	Suero
1	+	1280	5120	5120	6	-
2	+	-	1280	80	271	154
3	+	-	2560	320	72	359
4	+	40	20480	5120	-	797
5	+	-	40	40	461	-
6 <sup>c</sup>	-	-	40	40	-	-
7	+	20	1280	320	136	35
8	+	20	640	320	96	-
9	-	-	80	160	125	94
10 <sup>d</sup>	-	-	5120	320	29	-

Nº pct.: número de paciente; RB: Rosa de Bengala; SAT: seroaglutinación en tubo; Coombs: Coombs anti-*Brucella*; +: positivo; -: negativo; <sup>a</sup> Títulos recíprocos; <sup>b</sup> Resultado positivo expresado como copias de ADN de *B. melitensis*/ml muestra; <sup>c</sup> Una muestra de líquido sinovial del paciente nº 6 con artritis de rodilla fue positiva con 170 copias/ml; <sup>d</sup>Del paciente nº 10 intervenido de una espondilitis se obtuvo una muestra de médula ósea que fue positiva en la que se cuantificaron 57 copias/mg de tejido.

#### *En el periodo de seguimiento*

A excepción del paciente nº 6, todos los pacientes con enfermedad focal pudieron seguirse durante más de dos años. El periodo de seguimiento de estos pacientes con enfermedad focal osciló entre los 376 y 1636 días ( $1095 \pm 338$  días).

En la mayoría de los pacientes (70%), los títulos de anticuerpos registrados al inicio del estudio no variaron más de una dilución (aumento o disminución) entre dos muestras consecutivas. Sólo en un paciente (nº 1), los títulos de anticuerpos registrados mediante las pruebas Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup> disminuyeron con el tiempo.

Respecto al ensayo de PCRQtr, a excepción del paciente n° 6, que únicamente mostró positividad en la muestra de LS inicial, todos los pacientes con enfermedad focal presentaron ADN de *B. melitensis* de forma intermitente, en sangre, suero o ambos tipos de muestras. El único paciente en el que el ensayo de PCRQtr se negativizó fue el n° 1 que recibió tratamiento antimicrobiano durante más de un año. La persistencia de ADN de *B. melitensis* fue más regular en los pacientes que no recibieron tratamiento antimicrobiano.

#### ***Grupo B: pacientes con síntomas inespecíficos***

De los ocho pacientes con síntomas inespecíficos, cinco eran varones (63%) y tres mujeres (37%), con edades comprendidas entre los 35 y los 57 años ( $44 \pm 9$  años). Un 75% procedía del medio urbano y un 25% del medio rural. El tiempo transcurrido desde el último episodio de brucelosis aguda previo a la entrada en el estudio osciló entre los 6 los 33 años ( $14 \pm 8$  años).

#### Características del episodio agudo

Los antecedentes epidemiológicos de los pacientes con síntomas inespecíficos se muestran en la Tabla 15. El mecanismo más frecuente de adquisición de la primoinfección fue el contacto directo con ganado ovino o caprino o la manipulación de productos animales derivados que se presentó en cinco casos (62,5%). El resto de pacientes contrajo la enfermedad por consumo de productos lácteos sin pasteurizar. En dos casos, la fuente de contagio fue desconocida, no obstante, un paciente (n° 14) refirió frecuentar la finca de unos primos que tenían ganado. Factores de riesgo que en cualquier caso no estuvieron presentes durante la realización de este estudio.

En todos los casos, el diagnóstico del episodio de brucelosis aguda se realizó mediante serología para *Brucella* spp. (SAT  $\geq 1/160$  o Coombs  $\geq 1/320$ ) junto con una clínica compatible con brucelosis. Todos recibieron tratamiento antimicrobiano con doxiciclina sola, o en combinación con gentamicina, rifampicina o estreptomicina.

**Tabla 15.** Antecedentes epidemiológicos de los pacientes con síntomas inespecíficos (grupo B).

Nº pct.	Año del último episodio de brucelosis aguda	Factor de riesgo	Profesión
11	1996	c.d.p.l.s.p.	Trabajadora en granja de ciervos
12	1992	c.c.g.	Veterinario
13	1997	c.c.p.a.	Matarife
14	1997	Desconocido	Enfermera
15	1996	c.c.g., c.d.p.l.s.p., inyección accidental con cepa vacunal Rev-1	Veterinaria
16	1997	c.c.g., c.c.p.a., hábitat rural	Ganadero, carnicero
17	1991	c.c.p.a., hábitat rural	Trabajador industria quesera
18	1975	Desconocido	Alguacil

Nº pct.: número de paciente; c.d.p.l.s.p.: consumo de productos lácteos sin pasteurizar; c.c.g.: contacto con ganado caprino u ovino; c.c.p.a.: contacto con productos animales.

### Características clínicas

El motivo de consulta más frecuente de estos pacientes fue la presencia de dolores musculares y osteoarticulares generalizados sin signos de artritis, acompañados de astenia en seis casos (Tabla 16). El dolor se localizó de manera errática en la región cervical, región dorsal, región lumbar, hombros, tórax, escápulas, codos, manos, muñecas, rodillas, pies y tobillos. Otros síntomas esporádicos fueron cefalea, molestias abdominales, molestias en garganta, molestias oculares, visión borrosa, dermatitis, mareos, cuadros sincopales, pérdida de peso, febrícula y sudación. Todos los pacientes estaban diagnosticados de otras enfermedades. Las más frecuente fue el SFC que se presentó en cinco casos (62%). Otras enfermedades fueron hipotiroidismo, hipertensión, hiperlipidemia, diabetes mellitus tipo I, prostatitis e infección por virus de la hepatitis C.



**Tabla 16.** Características demográficas y clínicas de los pacientes con síntomas inespecíficos (grupo B).

Nº pct.	Edad/ Sexo	Enfermedad asociada	Clínica
11	36/M	Ansiedad, depresión	Poliartralgia, astenia, dolor cervical, cefalea
12	44/V	SFC, hepatitis C	Artromialgia, fatiga extrema
13	57/V	Prostatitis	Poliartralgia
14	49/M	SFC, DM I	Poliartralgia, astenia
15	42/M	SFC	Poliartralgia, fatiga, astenia
16	35/V	Hiperlipidemia	Poliartralgia
17	37/V	SFC	Poliartralgia, astenia
18	56/V	SFC, HTA, hipotiroidismo	Poliartralgia, astenia

Nº pct.: número de paciente; V: varón; M: mujer; SFC: síndrome de fatiga crónica; DM I: diabetes mellitus tipo I; HTA: hipertensión arterial.

### Tratamiento antimicrobiano y analítica general

Durante la realización del estudio, seis de los pacientes con síntomas inespecíficos (75%) recibieron tratamiento antimicrobiano entre 120 y 240 días ( $202 \pm 52$  días). Las pautas recibidas se muestran en la Tabla 17.

Los efectos secundarios tales como trastornos digestivos (pirosis, disfgia, vómitos, epigastralgia o dolor retroesternal con la deglución o una combinación de éstos) y la fotosensibilidad se valoraron como leves o moderados a excepción de un caso (nº 18) en el que una candidiasis orofaríngea obligó la suspensión del tratamiento. Los síntomas se resolvieron de forma definitiva sólo en uno (nº 11) de los cinco pacientes que completaron el tratamiento antimicrobiano. Los cuatro casos restantes se consideraron fallos terapéuticos al persistir con síntomas al final del periodo de tratamiento establecido.

La analítica general fue normal en todos los pacientes con síntomas inespecíficos.

**Tabla 17.** Tipo y duración del tratamiento antimicrobiano de los pacientes con síntomas inespecíficos (grupo B).

Nº pct.	Agente terapéutico (días)	Duración total en días	Evolución clínica
11	1: Dox. + Rif. (interrumpido); 2: TMP-SMZ (interrumpido); 3: Dox. (210)	230	Curación (asintomático)
13	1: Dox. (60); 2: Dox. (60); 3: Dox. (60); 4: Dox. (60)	240	Fallo terapéutico (poliartralgia)
14	1: Dox. (60) ; 2 : Dox. (45) + Estrep. (14); 3 : Dox. (45) + Estrep. (14) ; 4 : Dox. (90) + cotrimoxazol (90)	240	Fallo terapéutico (poliartralgia)
15	1: Dox. (180)	180	Fallo terapéutico (artromialgia)
16	1: Dox. (120) + Rif. (120)	120	Fallo terapéutico (poliartralgia)
18	1: Rif.	Interrumpido a los 30 días	Poliartralgia

Nº pct.: número de paciente; Dox.: doxiclina (100 mg/12 h); Rif.: rifampicina (900 mg/24 h); cotrimoxazol (TMP 160 mg/12 h y SMZ 800 mg/12 h); Estrep.: estreptomicina (1 g/24 h); HCQ: hidroxicloroquina.

### Pruebas serológicas y ensayo de PCRQtr

Se obtuvo entre 10 y 23 muestras de sangre y suero por paciente ( $15 \pm 4$  muestras) hasta un total de 258 muestras, 129 de sangre y 129 de suero.

#### *En la primera visita*

A la entrada en el estudio, todos los pacientes con síntomas inespecíficos presentó ADN de *B. melitensis* en sangre y/o suero. Por el contrario, el 75% de los pacientes presentó títulos de anticuerpos detectables mediante al menos una de las cuatro pruebas serológicas evaluadas. Como sucediera para los pacientes con enfermedad focal, todas las muestras que fueron positivas mediante las pruebas serológicas convencionales lo fueron también para la prueba de Brucellacapt®. En la Tabla 18 se muestra el resultado de las pruebas serológicas y el nivel de ADN bacteriano cuantificado correspondiente a la primera muestra que fue positiva para el ensayo de PCRQtr, que se sucedió entre la primera y la segunda visita.

**Tabla 18.** Resultado de las pruebas serológicas y la PCRQtr de los pacientes con síntomas inespecíficos (grupo B) a la entrada en el estudio.

Nº pct.	Nº mt.	RB	SAT <sup>a</sup>	Coombs <sup>a</sup>	Brucellacapt <sup>®a</sup>	PCRQtr <sup>b</sup>	
						Sangre	Suero
11	1 <sup>a</sup>	+	80	80	320	-	182
12	2 <sup>a</sup>	-	-	-	40	178	132
13	1 <sup>a</sup>	+	-	1280	320	6	-
14	1 <sup>a</sup>	+	80	320	640	3755	-
15	2 <sup>a</sup>	-	40	640	80	112	-
16	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	32	366
17	2 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	121
18	2 <sup>a</sup>	-	40	2560	160	25	-

Nº pct: número de paciente; Nº mt.: número de muestra; RB: Rosa de Bengala; SAT: seroaglutinación en tubo; Coombs: Coombs anti-*Brucella*; +: positivo; -: no detectable; <sup>a</sup> Títulos recíprocos; <sup>b</sup> Resultado positivo expresado como copias de ADN de *B. melitensis*/ml muestra.

#### *En el periodo de seguimiento*

Los pacientes con síntomas inespecíficos pudieron seguirse entre 494 y 1638 días ( $918 \pm 363$  días). Durante el seguimiento, en la mayoría de los pacientes (63%), el ensayo de PCRQtr fue positivo en sangre y/o suero de forma intermitente. Sin embargo, tres pacientes (nº 12, 15 y 17), después de una primera muestra positiva para el ensayo de PCRQtr, no volvieron a presentar ADN bacteriano. El seguimiento de estos pacientes fue de 515 días para el nº 12, 680 días para el nº 15 y 661 días para el nº 17, periodo en el que se analizaron 10, nueve y ocho muestras de sangre y suero, respectivamente.

Respecto a la serología, los títulos de anticuerpos iniciales detectados mediante la pruebas de Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup> no variaron más de una dilución (aumento o disminución) entre dos muestras consecutivas.

#### *Grupo C: sujetos asintomáticos*

De los 20 sujetos que integraban este grupo, 14 eran varones (70%) y 6 mujeres (30%), con edades comprendidas entre los 26 y los 83 años ( $50 \pm 15$  años). La mayoría

(70%) procedía del medio rural. El periodo de evolución de la enfermedad osciló entre los 3 y los 12 años ( $10 \pm 3$  años).

#### Características del episodio agudo

El mecanismo más frecuente de adquisición de la primoinfección fue la ingesta de productos lácteos sin higienizar que se presentó en 15 casos (75%), de los cuales cuatro habían estado en contacto directo con ganado ovino o caprino y tres con productos animales. En la Tabla 19 se recogen los antecedentes epidemiológicos de este grupo de sujetos.

En todos los sujetos excepto uno (nº 20), el episodio de brucelosis aguda se diagnosticó mediante el aislamiento de *Brucella* spp. en sangre. El diagnóstico del paciente nº 20 fue por serología para *Brucella* spp. (SAT  $\geq 1/160$  y Coombs anti-*Brucella*  $\geq 1/320$ ) junto con clínica compatible con brucelosis. Todos recibieron tratamiento antimicrobiano con doxiciclina sola, o en combinación con gentamicina, rifampicina o estreptomycinina.

**Tabla 19.** Antecedentes epidemiológicos de los sujetos asintomáticos (grupo C).

Nº pct.	Año del último episodio de brucelosis aguda	Factor de riesgo	Profesión
19	2006	c.c.g., hábitat rural	Ama de casa, ayudante pastor
20	2006	Desconocido	Trabajadora residencia ancianos
21	1997	c.d.p.l.s.p.	Desconocido
22	1998	c.d.p.l.s.p.	Estudiante
23	1997	c.c.g., hábitat rural	Agricultor
24	1997	c.c.g., c.d.p.l.s.p., hábitat rural	Tractorista, ayudante pastor
25	1997	hábitat rural	Trabajador en la construcción
26	1997	c.c.g., c.d.p.l.s.p., hábitat rural	Ama de casa, ayudante pastor
27	1997	c.d.p.l.s.p., hábitat rural	Desconocido
28	1997	c.d.p.l.s.p.	Enfermero
29	1997	c.c.g., hábitat rural	Pastor
30	1997	c.d.p.l.s.p.	Ama de casa
31	1997	c.c.g., hábitat rural	Encargado de una finca
32	2001	c.d.p.l.s.p., c.c.p.a., hábitat rural	Electricista en una empresa de productos lácteos
33	1997	c.d.p.l.s.p., c.c.p.a., hábitat rural	Ama de casa
34	1997	c.d.p.l.s.p., c.c.g., hábitat rural	Tractorista explotación ganadera
35	1997	c.d.p.l.s.p., c.c.p.a., hábitat rural	Electricista en una empresa de productos lácteos
36	2000	c.c.g., c.d.p.l.s.p., hábitat rural	Ganadero
37	1997	c.d.p.l.s.p., hábitat rural	Trabajador fábrica de cerámicas
38	1997	c.d.p.l.s.p.	Pastor

Nº pct.: número de paciente; c.c.g: contacto con ganado caprino u ovino; c.d.p.l.s.p.: consumo de productos lácteos sin pasteurizar; c.c.p.a. : contacto con productos animales.

Características clínicas

Desde la inclusión en el estudio hasta la finalización del mismo todos los sujetos de este grupo permanecieron asintomáticos. Las características demográficas y clínicas de estos sujetos a la entrada en el estudio se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Características demográficas y clínicas de los sujetos asintomáticos (grupo C).

Nº pct.	Edad/Sexo	Enfermedad asociada
19	41/M	Hemitiroidectomía por nódulo
20	50/M	Hipercolesterolemia
21	47/V	No
22	26/M	No
23	59/V	No
24	51/V	Obesidad
25	58/V	Hipercolesterolemia, BC, quistes pros.
26	48/M	Anemia ferropénica
27	35/V	Hernia, infección pasada por CMV
28	41/V	No
29	83/V	Valvulopatía, FA paroxística, HTA, dislipemia, hiperuricemia, Bronquitis crónica
30	42/M	No
31	64/V	Orquectomía, HTA, artrosis rodillas, abscesos perianales, cardiopatía
32	30/V	No
33	64/V	No
34	68/V	Adenoma prostático
35	34/V	Hernia de hiato
36	40/V	Obesidad
37	77/V	Apendictomizado, prótesis tobillo izquierdo, Parkinson, cálculos renales
38	46/V	Esterilidad

Nº pct.: número de paciente; V: varón; M: mujer; HTA, hipertensión arterial; FA: fibrilación auricular; CMV: citomegalovirus.

### Pruebas serológicas y ensayo de PCRQtr

Se obtuvo entre tres y siete muestras de sangre y suero por sujeto ( $15 \pm 4$  muestras) hasta un total de 167 muestras, 83 muestras de sangre, 83 muestras de suero y una muestra de válvula aórtica del sujeto nº 31, intervenido de una cardiopatía durante la realización del estudio.

#### *A la entrada en el estudio*

En la primera visita, 10 de los sujetos asintomáticos (50%) tuvieron serología y PCRQtr negativa. Los resultados de la serología y el ensayo de PCRQtr en sangre y suero en los 10 sujetos restantes se muestran en la Tabla 21. En la mayoría de los casos (70%), sólo mediante la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> se detectaron anticuerpos frente a *Brucella* spp. Respecto al ensayo de PCRQtr, éste fue positivo en cuatro sujetos (20%), los nº 26, 29, 32 y 36. El primer sujeto presentó ADN bacteriano en la primera visita, el segundo en la segunda y el resto en la tercera. Tres de los cuatro sujetos con PCRQtr positiva, (nº 26, 29 y 36), habían estado en contacto con ganado caprino u ovino durante la realización del estudio.

**Tabla 21.** Resultado de las pruebas serológicas y del ensayo de PCRQtr de los 11 sujetos asintomáticos con serología y/o PCRQtr positiva a la entrada en el estudio.

Nº pct.	RB	SAT <sup>a</sup>	Coombs <sup>a</sup>	Brucellacapt <sup>®a</sup>	PCRQtr <sup>b</sup>	
					Sangre	Suero
19	-	-	-	80	-	-
20	-	-	-	40	-	-
23	-	-	-	40	-	-
24	-	20	160	80	-	-
25	-	-	-	80	-	-
26	-	-	160	80	228	-
29	+	40	640	160	678	-
31	-	-	-	40	-	-
32	-	-	-	40	140	-
33	-	-	-	40	-	-
36	-	-	-	-	2511	-

Nº pct.: número de paciente; RB: Rosa de Bengala; SAT: seroaglutinación en tubo; +: positivo; -: no detectable; <sup>a</sup> Títulos recíprocos; <sup>b</sup> Resultado positivo expresado como copias de ADN de *B. melitensis*/ml muestra.

### *En el periodo de seguimiento*

Los sujetos asintomáticos se siguieron una media de 386 días (DE: 266; rango: 113-1014 días).

Durante el seguimiento, los títulos serológicos registrados en la primera visita no variaron más de una dilución (aumento o disminución) en todos los casos. Respecto al ensayo de PCRQtr, dos de los cuatro sujetos (nº 29 y 36) en los que inicialmente el fue positivo, presentaron de nuevo ADN de *B. melitensis*, el primero en una muestra de sangre y el segundo en una muestra de suero con 125 copias/ml y 2809 copias/ml, respectivamente.

### *Comparación de las características generales entre grupos*

La distribución de la edad, el sexo y el tiempo transcurrido desde el último episodio de brucelosis aguda hasta la inclusión en el estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Respecto al hábitat, el medio urbano predominó en el grupo de pacientes del grupo B con un 75% frente al grupo C con un 30% (Prueba exacta de Fisher,  $p=0,044$ ). A este respecto, no hubo diferencias entre los grupos A y B (Prueba exacta de Fisher,  $p=0,15$ ) ni entre los grupos A y C (Prueba exacta de Fisher,  $p=1,000$ ). En cuanto al modo en que contrajeron la primoinfección, el contacto directo con ganado caprino u ovino primó marginalmente para los pacientes con brucelosis crónica (grupos A y B) respecto al grupo de asintomáticos (Prueba exacta de Fisher,  $p=0,047$ ). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa entre grupos.

### *Pacientes con serología negativa*

Dos pacientes del grupo B (nº 16 y 17) tuvieron serología negativa para *Brucella* spp. tanto para las pruebas serológicas clásicas (RB, SAT y Coombs) como para la prueba Brucellacapt®. Sin embargo, el ensayo de PCRQtr fue positivo en ambos pacientes, en seis de las 14 muestras (43%) del paciente nº 16 y una de las 10 muestras de sangre y suero del paciente nº 17.



Cuatro de las 10 muestras del paciente nº 16 se remitieron al Dr. Ramón Díaz del Hospital Universitario de Pamplona (Navarra) para su evaluación mediante las pruebas serológicas RB, SAT, Coombs, doble difusión en gel (DDG) e inmunodifusión radial (IDR). Las pruebas RB, DGG e IDR fueron negativas. Sin embargo, mediante las pruebas de SAT y Coombs realizadas a pH ácido se detectó anticuerpos anti-*Brucella* en todas las muestras.

### **AISLAMIENTO DE *BRUCELLA* SPP. EN CULTIVO**

Todos los hemocultivos procesados para cultivo fueron negativos. De las 60 muestras de sangre analizadas, 24 pertenecían a los pacientes del grupo A, 24 a los pacientes del grupo B y 12 a los sujetos del grupo C. También se procesó para cultivo una muestra de médula ósea del paciente nº 10 intervenido de una espondilitis, una muestra de LCR perteneciente al paciente nº 5 con una neuropatía motora multifocal y una muestra de LS del paciente nº 7 con artritis de rodilla. Únicamente se observó crecimiento de *Brucella* spp. en la biopsia de médula ósea del paciente nº 10.

### **ESTUDIO DEL ENSAYO DE PCRQtr**

#### **Valoración de la capacidad diagnóstica del ensayo de PCRQtr. Comparación con las pruebas serológicas**

Todos los pacientes con enfermedad focal (grupo A) y los pacientes con síntomas inespecíficos (grupo B) presentaron ADN de *B. melitensis* en sangre, suero u otro tipo de muestra biológica. Este porcentaje fue significativamente superior al 20% encontrado en el grupo de sujetos asintomáticos (grupo C), y al 3% del grupo control (Prueba exacta de Fisher,  $p < 0,001$ ).

Para la determinación de la sensibilidad clínica, especificidad clínica, CP positivo (CP+) y CP negativo (CP-) de las distintas pruebas evaluadas, se consideraron como casos los 18 pacientes con brucelosis crónica (grupos A y B) y como controles, los 20 sujetos asintomáticos (grupo C) y los 38 sujetos del grupo control. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22. La prueba que presentó mayor sensibilidad clínica fue el ensayo de PCRQtr en sangre y suero con un 94%, seguido del ensayo de PCRQtr en sangre con un 78% y de la prueba de Coombs con un 61%. La sensibilidad d

el ensayo de PCRQtr en suero, de la prueba RB y de la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> fue del 50%. La especificidad de las pruebas osciló entre el 91% y el 100%.

**Tabla 22.** Sensibilidad, especificidad, CP + y CP- del ensayo de PCRQtr, las pruebas serológicas convencionales y el Brucellacapt<sup>®</sup> a la entrada en el estudio.

Prueba	Sensibilidad (IC95%)	Especificidad (IC95%)	CP+ (IC95%)	CP- (IC95%)
RB	50 (26-74)	98 (91-100)	29 (4-214)	0,51 (0,3-0,8)
SAT <sup>a</sup>	11 (1-35)	100 (94-100)	*	0,89 (0,7-1)
Coombs <sup>b</sup>	61 (36-83)	96 (88-100)	18 (4-73)	0,4 (0,2-0,7)
Brucellacapt <sup>b</sup>	50 (26-74)	100 (94-100)	*	0,5 (0,3-0,8)
PCRQtr - Sangre	78 (59-97)	91 (84-99)	9 (4-22)	0,24 (0,1-0,6)
PCRQtr- Suero	50 (27-73)	100 (100-100)	*	0,5 (0,3-0,79)
PCRQtr SG y SU	94 (84-100)	91 (84-99)	11(5-26)	0,06 (0,01-0,4)

SG: sangre; SU: suero; <sup>a</sup> Valor positivo para un título  $\geq 1/160$ ; <sup>b</sup> Valor positivo para un título  $\geq 1/320$ ; \*: no realizado por razones matemáticas (división por cero); resultados obtenidos para un valor de  $p=0,001$ .

Si consideramos el total de muestras analizadas de los pacientes con brucelosis crónica (grupos A y B), las tres pruebas que demostraron mayor porcentaje de muestras positivas fueron la prueba de Coombs con un 51%, la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> con un 44% y la prueba RB con un 42% (Tabla 23).

**Tabla 23.** Porcentaje de muestras positivas para las pruebas RB, SAT, Coombs, Brucellacapt<sup>®</sup> y PCRQtr de pacientes con brucelosis crónica (grupos A y B).

Prueba	Número de muestras analizadas	Número de muestras positivas (%)
RB	244	103 (42)
SAT <sup>a</sup>	204	19 (9)
Coombs <sup>b</sup>	219	112 (51)
Brucellacapt <sup>b</sup>	257	112 (44)
PCRQtr -Sangre	263	53 (20)
PCRQtr-Suero	262	45 (17)
PCRQtr-SG y SU	263	76 (29)

SG: sangre; SU: suero; <sup>a</sup> Valor positivo cuando para un título  $\geq 1/160$ ; <sup>b</sup> Valor positivo para un título  $\geq 1/320$ .

### Estudio cualitativo y de la carga bacteriana basal

Para el estudio comparativo del porcentaje de muestras positivas mediante el ensayo de PCRQtr y de la carga bacteriana basal entre grupos, se consideraron las muestras obtenidas en los tres primeros meses de seguimiento, antes de que los pacientes recibieran tratamiento antimicrobiano. Se analizaron entre una y cuatro muestras por sujeto hasta un total de 142 muestras (71 de sangre y 71 de suero).

En la Tabla 24 se muestra el porcentaje de muestras positivas mediante el ensayo de PCRQtr y la carga bacteriana basal, de acuerdo al grupo de sujetos y al tipo de muestra.

**Tabla 24.** Porcentaje de muestras positivas para el ensayo de PCRQtr y carga bacteriana según el grupo de estudio (A, B o C) y tipo de muestra (sangre o suero).

Grupo	Muestras positivas/total analizadas (%)		Cuantificación <sup>a</sup>	
	Sangre	Suero	Sangre	Suero
A	12/18 (67)	6/18 (33)	396 ± 1184	791 ± 2132
B	5/16 (31)	4/16 (25)	251 ± 935	77 ± 201
C	3/37 (8)	0/37	92 ± 425	-

<sup>a</sup> Resultados expresados en copias de ADN de *B. melitensis*/ml muestra (media ± DE).

El porcentaje de muestras positivas mediante el ensayo de PCRQtr, no difirió de forma significativa entre los grupos A y B ni para las muestras de sangre ( $p=0,08$ ) ni para las muestras de suero ( $p=0,87$ ). Sin embargo, entre los grupos A y C, si encontramos diferencias estadísticamente significativas tanto en sangre como en suero ( $p<0,01$ ); también entre los grupos B y C para las muestras de suero ( $p<0,01$ ) pero no para las de sangre ( $p=0,08$ ).

Respecto a la carga bacteriana, entre los grupos A y B no difirió de forma estadísticamente significativa ni para las muestras de sangre (prueba T muestras independientes,  $p=0,69$ ) ni para las muestras de suero (prueba T muestras independientes,  $p=0,18$ ). Tampoco entre los grupos A y C, ni en sangre (prueba T muestras independientes,  $p=0,3$ ) ni en suero (prueba T muestras independientes,  $p=$

0,13), o entre los grupos B y C ni en sangre (prueba T muestras independientes,  $p=0,52$ ) ni en suero (prueba T muestras independientes,  $p=0,15$ ).

### Evolución de la carga bacteriana antes, durante y después del tratamiento antimicrobiano

Para analizar la evolución del ADN bacteriano con el tiempo, dividimos las muestras según el periodo en que fueron obtenidas en: (i) periodo previo al tratamiento, (ii) primer mes de tratamiento, (iii) desde el segundo mes de tratamiento hasta la finalización del mismo, (iv) primeros dos años de seguimiento post-tratamiento y, (v) desde el tercer año de seguimiento hasta la finalización del mismo. En el caso de los pacientes que completaron más de un ciclo de tratamiento antimicrobiano con periodos de descanso entre ellos, se consideraron las muestras pertenecientes al primer tratamiento.

#### Grupo A: Pacientes con enfermedad focal

En la Figura 8 se muestra la evolución de la carga bacteriana media en los seis pacientes con enfermedad focal que recibieron tratamiento antimicrobiano.

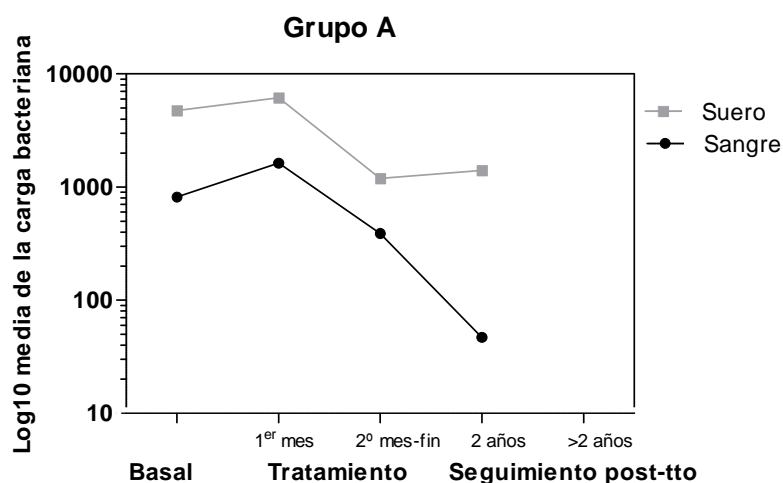


Figura 8. Evolución de la carga bacteriana en los seis pacientes con enfermedad focal que completaron el tratamiento antimicrobiano.

Durante el periodo basal o previo al tratamiento, que osciló entre uno y 203 días ( $95 \pm 88$  días), se obtuvo entre dos y tres muestras de sangre y suero por paciente. El ensayo de PCRQtr fue positivo en siete de las 15 muestras de sangre (47%) y tres de las 14 muestras de suero (21%), con una carga bacteriana media de  $816 \pm 1868$  copias/ml (mediana: 121;  $p_{25}-p_{75}$ : 70-198 copias/ml), y  $4732 \pm 3295$  copias/ml (mediana: 6594;  $p_{25}-p_{75}$ : 3761-6614 copias/ml), respectivamente.

En los primeros 30 días de tratamiento, a excepción del paciente n° 2 del que no se recogió muestra, se analizó entre una y ocho muestras de sangre y suero por paciente hasta un total de dieciséis. De éstas, seis muestras fueron positivas en sangre (38%) y una en suero (6%). En el caso de las muestras de sangre, la media de la carga bacteriana aumentó ligeramente hasta  $1622 \pm 2385$  copias/ml (mediana: 117;  $p_{25}-p_{75}$ : 67-2356) aunque de forma no significativa (Prueba T muestras independientes,  $p=0,60$ ). La única muestra de suero positiva pertenecía al paciente n° 10 y presentó una carga bacteriana de 6146 copias/ml.

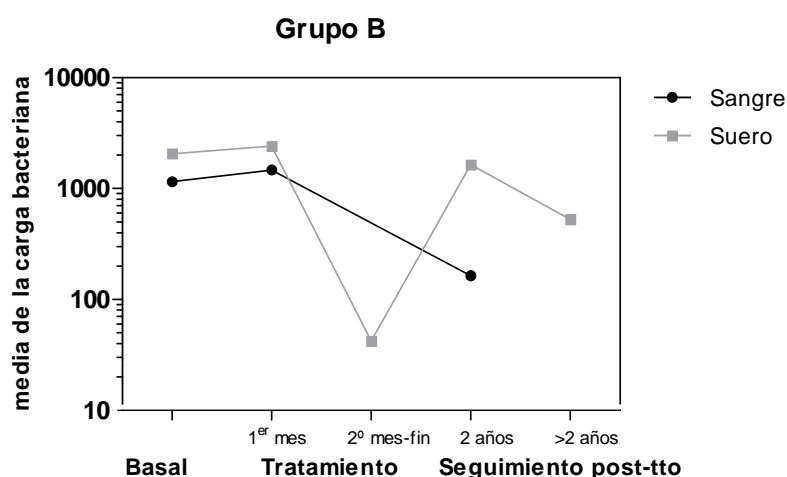
Desde el inicio del segundo mes de tratamiento hasta la finalización del mismo, a excepción del paciente n° 6, para el que no se obtuvo muestra en este periodo, se analizaron entre una y cuatro muestras de sangre y suero por paciente. De las 11 muestras de sangre y suero analizadas, cinco fueron positivas en sangre (45%) y tres en suero (27%). La media de la carga bacteriana disminuyó tanto en sangre como en suero, cuantificándose  $389 \pm 482$  copias/ml (mediana: 93;  $p_{25}-p_{75}$ : 76-486) y  $1193 \pm 1695$  copias/ml (mediana: 354;  $p_{25}-p_{75}$ : 240-1041) copias/ml, respectivamente.

El periodo de seguimiento post-tratamiento osciló entre 87 y 468 días para los pacientes n° 5, 6 y 9, y entre 973 y 1054 días para el resto. En los primeros dos años de seguimiento post-tratamiento se analizaron entre una y 11 muestras por paciente. De las 28 muestras analizadas, dos fueron positivas en sangre (7%) y dos en suero (7%). La media de la carga bacteriana en sangre continuó descendiendo, cuantificándose  $47 \pm 11$  copias/ml (mediana: 47;  $p_{25}-p_{75}$ : 43-51). Sin embargo, la media de la carga bacteriana en suero aumentó ligeramente hasta  $1402 \pm 283$  copias/ml (mediana: 1402;  $p_{25}-p_{75}$ : 1302-1502) con respecto al tratamiento.

Dos pacientes (nº 1 y 2), pudieron seguirse más de dos años. Sólo las muestras de sangre y suero de un paciente (nº1) fueron negativas mediante el ensayo de PCRQtr.

**Grupo B: pacientes con síntomas inespecíficos**

La evolución de la carga bacteriana de los cinco pacientes con síntomas inespecíficos que completaron el tratamiento se muestra en la Figura 9. La evolución de la carga bacteriana en estos pacientes fue similar a la descrita para los pacientes con enfermedad focal.



**Figura 9. Evolución de la carga bacteriana en los cinco pacientes con síntomas inespecíficos que completaron el tratamiento antimicrobiano.**

En el periodo basal o previo al tratamiento antimicrobiano, que osciló entre uno y 390 días, se analizó entre una y ocho muestras por paciente hasta un total de 34 muestras, 17 de sangre y 17 de suero. Del total de muestras analizadas, seis fueron positivas en sangre (35%) y dos en suero (12%). La carga bacteriana media fue de  $1152 \pm 1461$  copias/ml (mediana: 702; p<sub>25</sub>-p<sub>75</sub>: 52-2179) en sangre y de  $2054 \pm 2544$  copias/ml (mediana: 909; p<sub>25</sub>-p<sub>75</sub>: 255-4250) en suero.

En los primeros 30 días de tratamiento se analizaron entre una y dos muestras por paciente hasta un total de 16 muestras, ocho de sangre y ocho de suero. Dos de las ocho muestras fueron positivas tanto en sangre como en suero (25%). A diferencia de los

pacientes focales, durante este periodo, la media de la carga bacteriana aumentó ligeramente tanto en sangre como en suero, hasta alcanzar  $1469 \pm 465$  copias/ml (mediana: 1469;  $p_{25}$ - $p_{75}$ : 1140-1798) en el primer caso y  $2406 \pm 1120$  copias/ml (mediana: 2406;  $p_{25}$ - $p_{75}$ : 1614-3198) en el segundo. Desde el inicio del segundo mes de tratamiento hasta la finalización del mismo, se analizaron entre una y tres muestras hasta un total de nueve muestras de sangre y suero de las cuales sólo una muestra de suero (11%) fue positiva, cuantificándose 42 copias/ml.

En los primeros dos años de seguimiento post-tratamiento se analizaron un total de 29 muestras de sangre y suero (rango: 2-10 muestras). Siete muestras fueron positivas en sangre (24%) y siete en suero (24%). La media de la carga bacteriana aumentó tanto en sangre como en suero cuantificándose  $164 \pm 219$  copias/ml (mediana: 77;  $p_{25}$ - $p_{75}$ : 60-124) y  $1635 \pm 1621$  copias/ml (mediana: 1150;  $p_{25}$ - $p_{75}$ : 416-2719), respectivamente.

Un paciente (nº 13) se siguió durante cuatro años y medio. En los últimos dos años de seguimiento, se analizaron siete muestras de sangre y suero, de las cuales una muestra de suero fue positiva con 525 copias/ml. Esta muestra correspondía a los cuatro años y dos meses de seguimiento.

### **Comparación del ensayo de PCRQtr en sangre y suero**

Con el objetivo de estimar el tipo de muestra óptima, sangre o suero, a utilizar en el ensayo de PCRQtr, se estudió, por un lado, la asociación entre presentar un resultado positivo en sangre y suero, y el índice de concordancia (kappa) entre ambos tipos de muestras. Por otro lado, se analizó el nivel de ADN de *B. melitensis* cuantificado en ambos tipos de muestras y la correlación entre ellas.

#### ***Asociación, concordancia y correlación entre la muestra de sangre y suero***

##### ***Análisis con una muestra por sujeto***

Para llevar a cabo este análisis, se tuvo en cuenta la primera muestra recogida en la que se detectó ADN de *B. melitensis* de cada uno de los 76 sujetos incluidos en el estudio.

De las 76 muestras de sangre y suero analizadas, 18 fueron positivas en sangre (22%) y 9 en suero (12%), con una diferencia no significativa del 10% a favor de la sangre (IC95%: -1%; 17,99%; prueba de McNemar;  $p = 0,077$ ), lo que demuestra que un tipo de muestra no puede ser reemplazada por la otra. El valor estimado del coeficiente de concordancia kappa ( $k$ ) fue de 0,2719 ( $n = 76$ ; IC95%: 1%-53%;  $p = 0,01$ ), lo que indica que hay una concordancia débil entre el ensayo de PCRQtr en sangre y en suero.

El coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) fue de 0,2639 ( $n = 76$ ; IC95%: 0,03-0,46) por lo que, aunque débil, también hay una correlación positiva entre ambos tipos de muestras con una diferencia entre ambas marginalmente significativa ( $p = 0,02$ ).

#### *Análisis con el total de muestras analizadas*

Realizamos el mismo análisis teniendo en cuenta el número total de muestras obtenidas. De las 357 muestras de sangre y suero analizadas, 57 fueron positivas en sangre (16%) y 46 en suero (13%), con una diferencia no significativa del 3% a favor de la sangre (IC95%: -1%; 18%; prueba de McNemar;  $p = 0,324$ ), lo que demuestra que un tipo de muestra no puede ser reemplazada por la otra. El valor estimado del coeficiente de concordancia kappa ( $k$ ) fue de 0,135 ( $n = 357$ ; IC95%: 0,02%-0,24%;  $p = 0,008$ ) lo que indica que hay una concordancia muy débil o insignificante entre el ensayo de PCRQtr en sangre y en suero.

El coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) fue de 0,2639 ( $n = 357$ ; IC95%: 0,1; 0,29;  $p = 0,0001$ ) lo que indica que, aunque débil, también hay una correlación positiva entre ambos tipos de muestras.

#### *Comparación de la carga bacteriana media en sangre y suero*

Para el estudio comparativo de la carga bacteriana media en sangre y suero, seleccionamos las muestras que habían sido positivas en ambos tipos de muestra, con independencia del periodo en que fueron recogidas y del sujeto al que pertenecían.

Se analizaron un total de 44 muestras, 22 muestras de sangre y 22 muestras de suero, de las cuales 12 pertenecían a los 10 pacientes del grupo A y 10 muestras a cinco pacientes del grupo B.



La media de la carga bacteriana cuantificada en ambos tipos de muestra de manera conjunta y por separado según pertenecieran al grupo A o B se refleja en la Figura 10. Globalmente, se cuantificó una media de 713 copias/ml (DE: 1087; IC95%: 156-1120) en sangre y 1562 copias/ml (DE: 2261; IC95%: 691-2697) en suero, siendo esta diferencia significativa (Prueba T muestras relacionadas,  $p=0,013$ ). Esta diferencia en la carga bacteriana también se observó cuando separamos las muestras según procedieran del grupo A o B.

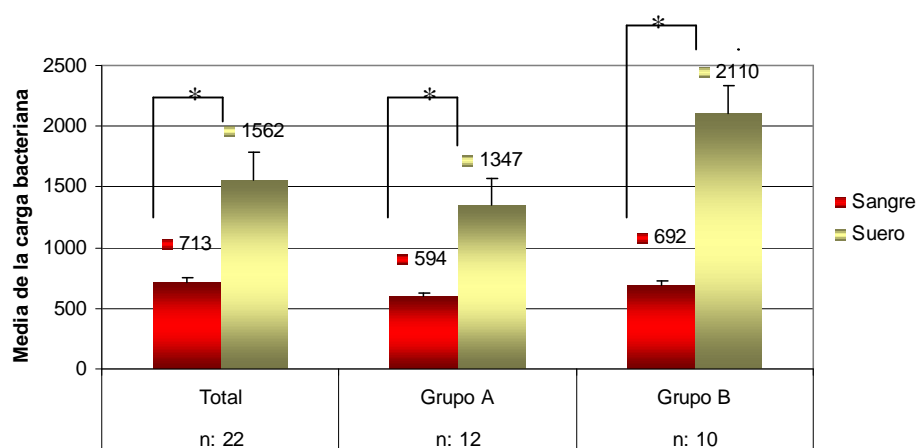


Figura 10. Comparación de la carga bacteriana media en sangre y suero.

## ESTUDIO DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS

### Comparación del título de anticuerpos detectado por las pruebas SAT, Coombs anti-*Brucella* y Brucellacapt®

Para la realización de este análisis se consideraron todas las muestras obtenidas de los 38 sujetos con antecedentes de brucelosis y los 38 individuos del grupo control. En la Tabla 25 se muestra la mediana, mínimo y máximo de los títulos detectados mediante las pruebas serológicas SAT, Coombs y Brucellacapt®.

De este análisis se extrae, por un lado, que el título de anticuerpos detectado mediante la prueba de SAT no difirió entre grupos. Sólo en el caso de los pacientes con brucelosis crónica (grupos A y B), este título fue cuatro y seis veces inferior al detectado mediante las pruebas de Coombs y Brucellacapt®.

Por otro lado, tampoco el título detectado mediante las pruebas de Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup> difirió entre grupos. Sólo en el caso de los pacientes con enfermedad focal (grupo A), el título de anticuerpos detectado mediante la prueba de Coombs fue superior al de la prueba Brucellacapt<sup>®</sup>.

**Tabla 25.** Mediana (mínimo-máximo) de las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup>.

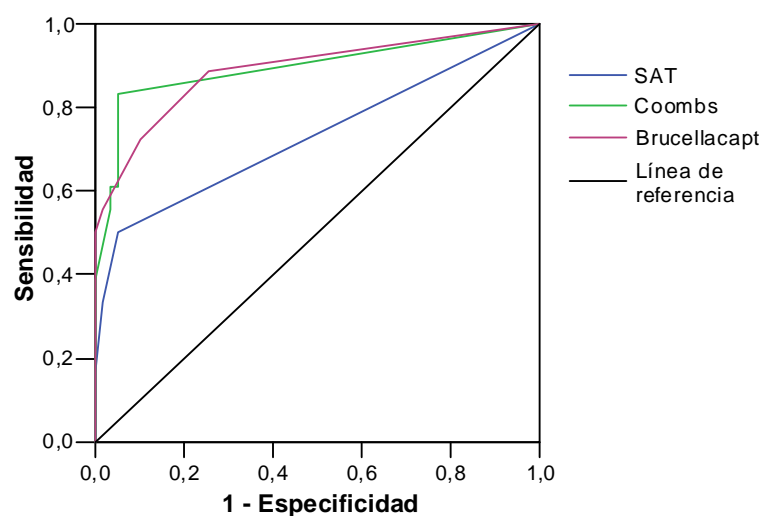
Grupo	SAT <sup>a</sup>	Coombs <sup>a</sup>	Brucellacapt <sup>®a</sup>
A	0 (0-1280)	640 (0-40960)	160 (40-5120)
B	0 (0-160)	160 (0-10240)	160 (0-640)
C	0 (0-40)	0 (0-640)	40 (0-160)
Control	ND	ND	0 (0-80)
Total	0 (0-1280)	0 (0-40960)	80 (0-5120)

<sup>a</sup> Títulos recíprocos; ND: no hay datos; Grupo A: pacientes con enfermedad focal; Grupo B: pacientes con síntomas inespecíficos; Grupo C: sujetos asintomáticos.

### **Determinación del punto de corte óptimo de las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup>**

Comparamos la capacidad discriminante de las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup> mediante el análisis de la curva COR tomando como prueba de referencia el diagnóstico clínico de brucelosis crónica. Así, los pacientes de los grupos A y B se consideraron casos y los 38 sujetos del grupo control y los 20 sujetos asintomáticos (grupo C) como controles. Para llevar a cabo este análisis se tuvo en cuenta la primera muestra obtenida de cada uno de los 76 sujetos.

En la Figura 11 se muestran las curvas COR de las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup>.



**Figura 11. Curva COR de las pruebas SAT, Coombs anti-*Brucella* y Brucellacapt®**

Aunque el área bajo la curva de la prueba Coombs fue ligeramente superior a la prueba Brucellacapt®, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,523$ ) (Tabla 26). Sin embargo, la diferencia entre el área de ambas curvas con respecto a la prueba de SAT sí lo fue ( $p: 0,015$ ).

**Tabla 26. Resultados del análisis de la curva COR de las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt®**

Prueba	ABC	IC95%*	p-valor <sup>a</sup>
SAT	0,73	0,61-0,85	0,0002
Coombs	0,89	0,80-0,98	0,0001
Brucellacapt®	0,88	0,79-0,98	0,0001

ABC: área bajo la curva; \* en ningún caso el IC95% incluye el valor 0,5; <sup>a</sup> Según Delong.

En la Tabla 27 se muestra señalado con un asterisco el punto de corte con el máximo de sensibilidad y especificidad asociados, determinados a partir de las curvas COR. En el caso de la prueba Coombs, teniendo en cuenta que en el grupo control el

título máximo registrado fue de 1/640, si consideráramos el punto de corte óptimo que establece la curva COR ( $\geq 1/40$ ), se determinaría una zona de resultados dudosos muy amplia, comprendida entre  $\geq 1/40$  y 1/640. El punto de corte para el diagnóstico de la brucelosis de  $\geq 1/320$  establecido en la literatura, presenta una sensibilidad y especificidad asociadas de 61% y 96%, respectivamente. En el caso de la prueba Brucellacapt<sup>®</sup>, el título máximo detectado en los sujetos controles ha sido de 1/160, una dilución inferior al punto de corte establecido en la literatura para el diagnóstico de la brucelosis. La zona de resultados dudosos para esta prueba no sería tan amplia y estaría comprendida entre 1/40 y 1/160.

De estos resultados se extrae que el punto de corte de las pruebas Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup> establecido en la literatura para el diagnóstico de la brucelosis crónica parece muy alto para el diagnóstico de los pacientes con brucelosis crónica. A igual sensibilidad aunque a espensas de bajar un poco la especificidad, podríamos considerar el umbral en  $\geq 1/160$  para ambas pruebas.

**Tabla 27.** Puntos de corte y sensibilidad y especificidad asociadas del SAT, Coombs y Brucellacapt®.

Prueba de seroaglutinación o SAT								
Sensibilidad		Especificidad		CP+		CP-		
Criterio	Valor	IC95%	Valor	IC95%	Valor	IC95%	Valor	IC95%
≥0	100	81 - 100	0	0 - 6	1,00	*	*	*
≥20*	50	25 - 74	96	88 - 100	14,5	9,1 - 23,1	0,52	0,1 - 2,2
≥40	33	13 - 59	98	91 - 100	19,3	10,1 - 37,2	0,68	0,09 - 4,9
≥80	17	4 - 41	100	94 - 100	*	*	0,83	*
≥160	11,1	1 - 35	100	94 - 100	*	*	0,89	*
≥1280	6	0,1 - 27	100	94 - 100	*	*	0,94	*
≥2560	0,0	0 - 18	100	94 - 100	*	*	1,00	*

Coombs anti-Brucella								
Sensibilidad		Especificidad		CP+		CP-		
Criterio	Valor	IC95%	Valor	IC95%	Valor	IC95%	Valor	IC95%
≥0	100	81 - 100	0	0 - 6	1,0	*	*	*
≥40*	83	59 - 96	95	86 - 99	16,4	13,0 - 20,0	0,18	0,04 - 0,8
≥80	72	46 - 90	95	86 - 99	13,9	10,4 - 18,7	0,29	0,08 - 1,1
≥160	61	36 - 83	95	86 - 99	11,8	8,1 - 17,2	0,41	0,1 - 1,4
≥320	61	36 - 83	96	88 - 100	17,7	12,2 - 25,7	0,4	0,09 - 1,8
≥640	56	31 - 78	96	88 - 100	16,1	10,6 - 24,4	0,46	0,1 - 2
≥1280	39	17 - 64	100	94 - 100	*	*	0,61	*
≥2560	22	6 - 48	100	94 - 100	*	*	0,78	*
≥5120	17	4 - 41	100	94 - 100	*	*	0,83	*
≥20480	5	0,1 - 27	100	94 - 100	*	*	0,94	*
≥40960	0	0 - 18	100	94 - 100	*	*	1	*

Brucellacapt®								
Sensibilidad		Especificidad		CP+		CP-		
Criterio	Valor	IC95%	Valor	IC95%	Valor	IC95%	Valor	IC95%
≥0	100	81-100	0	0 - 6	1,00	*	*	*
≥40*	89	65 - 96	74	61 - 85	3,44	2,7 - 4,3	0,15	0,04 - 0,6
≥80	72	46 - 90	90	79 - 96	6,98	5,2 - 9,4	0,31	0,1 - 0,9
≥160	56	31 - 78	98	91 - 100	35,22	21,3 - 43,8	0,45	0,06 - 3,4
≥320	50	26 - 74	100	94 - 100	*	*	0,50	*
≥640	17	4 - 41	100	94 - 100	*	*	0,83	*
≥1280	11	1 - 35	100	94 - 100	*	*	0,89	*
≥2560	0	0 - 18	100	94 - 100	*	*	1	*

\*: no realizado por razones matemáticas (división por cero).

### Relación entre la presencia de ADN de *B. melitensis* y las inmunoglobulinas anti-*Brucella*

Se estudió la asociación entre presentar anticuerpos anti-*Brucella* y ADN de *B. melitensis* en los 76 sujetos incluidos en el estudio, 38 sujetos del grupo de estudio y 38 sujetos del grupo control.

Encontramos asociación entre la presencia de anticuerpos detectados mediante cualquiera de las cuatro pruebas serológicas evaluadas y la presencia de ADN bacteriano a cualquier nivel (prueba Fisher,  $p < 0,001$ ) (Tabla 28).

**Tabla 28.** Relación entre la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* y la presencia de ADN de *B. melitensis*.

		Anticuerpos anti- <i>Brucella</i>		
		Positivo	Negativo	
PCRQtr	Positivo	20	3	23
	Negativo	11	42	53
		31	45	76

Si consideráramos los títulos de anticuerpos anti-*Brucella* detectados mediante la prueba de Coombs y/o Brucellacapt<sup>®</sup>, para un título  $\geq 1/320$ , también habría asociación entre la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* y la presencia de ADN de *B. melitensis* en sangre y/o suero a cualquier nivel (prueba Fisher,  $p > 0,001$ ) (Tabla 29).

**Tabla 29.** Relación entre presentar anticuerpos anti-*Brucella* a títulos  $\geq 1/320$  y la presencia de ADN de *B. melitensis*.

		Anticuerpos anti- <i>Brucella</i>		
		Positivo	Negativo	
PCRQtr	Positivo	13	7	22
	Negativo	0	54	54
		13	63	76

### Pruebas serológicas realizadas en Vircell S.L

Con el fin de contrastar los resultados obtenidos en la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup>, enviamos 10 muestras de suero escogidas al azar a su fabricante (Laboratorios Vircell S.L, Granada). Este laboratorio realizó además otras pruebas serológicas complementarias cuyos resultados se comparan con los nuestros en la Tabla 30. De esta tabla se extrae que los resultados de las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup> concuerdan entre el CHUA y Vircell S.L.

**Tabla 30.** Comparación de los resultados de las pruebas serológicas realizadas por el Servicio de Microbiología del CHUA y los laboratorios Vircell S.L.

Nº mt	CHUA			VIRCELL S.L				
	SAT <sup>a</sup>	Coombs <sup>a</sup>	Bcapt <sup>®a</sup>	SAT <sup>a,*</sup>	Coombs <sup>a</sup>	Bcapt. <sup>®a</sup>	ELISA IgM	ELISA IgG
1	-	-	40	-	40	40	-	-
2	-	-	40	-	40	40	-	-
3	-	-	40	-	40	40	-	-
4	-	640	40	-	640	40	-	+
5	-	2560	320	-	1280	160	-	+
6	-	1280	160	-	1280	160	-	+
7	-	-	320	-	40	160	-	-
8	-	640	160	-	320	80	-	+
EA	160	20480	5120	-	5120	5120	-	+

Nº mt: número de muestra; CHUA: Complejo Hospitalario Universitario de Albacete; Bcapt.<sup>®</sup>: Brucellacapt<sup>®</sup>; <sup>a</sup> Títulos recíprocos; -: negativo; +: positivo; \*El SAT realizado con y sin ditiotritol mostró los mismos resultados; EA: episodio agudo.





# **DISCUSIÓN**

---



La gran diversidad de síntomas generales y formas focales de la brucelosis, así como las notables diferencias en la intensidad de estas manifestaciones clínicas comporta gran dificultad en el control clínico de la enfermedad, especialmente durante los meses siguientes al tratamiento antimicrobiano. Por un lado, el hemocultivo, método de referencia en el diagnóstico de la brucelosis aguda es muy poco o nada sensible en estadíos avanzados de la enfermedad. Por otro, todavía no se ha establecido un criterio de curación a la hora de interpretar la persistencia de un título igual o superior a 1/320 de anticuerpos IgG anti-*Brucella*, herramienta más utilizada en estos casos.

A este nivel, la aparición de pruebas moleculares para la detección de ADN de *Brucella* spp. parece importante. Aunque en los últimos 20 años se han desarrollado numerosos ensayos basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la mayoría de los estudios se han centrado en el diagnóstico del episodio inicial (Al-Attas *et al.*, 2000; Al-Dahouk *et al.*, 2005; Al-Nakkas *et al.*, 2002; Al-Nakkas *et al.*, 2005; Briones-Lara *et al.*, 2007; Cirak y Hizel, 2002; Colmenero *et al.*, 2002(b); Colmenero *et al.*, 2005; Debeaumont *et al.*, 2005; Elfaki *et al.*, 2005(a); Elfaki *et al.*, 2005b, Navarro *et al.*, 2006; Maas *et al.*, 2007; Matar *et al.*, 1996; Mitka *et al.*, 2007; Morata *et al.*, 2001; Morata *et al.*, 2003; Navarro-Martínez *et al.*, 2007; Nimri *et al.*, 2003; Purwar *et al.*, 2006; Queipo-Ortuño *et al.*, 1997; Queipo-Ortuño *et al.*, 2004; Queipo-Ortuño *et al.*, 2005; Queipo-Ortuño *et al.*, 2006; Queipo-Ortuño *et al.*, 2008; Theegarten *et al.*, 2008; Vrioni *et al.*, 2004; Zerva *et al.*, 2001).

Sólo tres de estos estudios han incluido algunos pacientes con brucelosis crónica (Al-Nakkas *et al.*, 2005; Elfaki *et al.*, 2005; Nimri *et al.*, 2003). La escasa documentación a este respecto fue la que nos impulsó a estudiar la utilidad de un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (PCRQtr) en el diagnóstico y seguimiento de una cohorte de sujetos con una historia previa de brucelosis. Para ello, los sujetos se clasificaron en tres grupos: pacientes con enfermedad focal, pacientes con síntomas inespecíficos y sujetos asintomáticos.

## **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO**

Los 38 sujetos incluidos en el presente estudio no difieren significativamente en cuanto a la edad y sexo del resto de series publicadas sobre el diagnóstico de la

brucelosis aguda (Bosilkovski *et al.*, 2007; Buzgan *et al.*, 2010; Colmenero *et al.*, 1996; Lulu *et al.*, 1988; Mousa *et al.*, 1988), confirmándose que es una enfermedad que con frecuencia afecta a varones procedentes del medio rural con una edad comprendida entre los 30 y los 40 años.

En países donde la enfermedad es endémica, la vía principal de transmisión es la ingesta de productos lácteos sin pasteurizar, mientras que en países desarrollados la infección ocurre principalmente por exposición ocupacional (Buzgan *et al.*, 2010). En nuestro estudio, la mayoría de los pacientes con brucelosis crónica, con o sin enfermedad localizada, presentaban una historia previa de contacto directo con ganado o con productos animales derivados. Sin embargo, en el grupo de los sujetos asintomáticos con antecedentes de brucelosis predominó como fuente de infección el consumo de productos lácteos sin pasteurizar.

La brucelosis humana ha sido clasificada de forma arbitraria en varias categorías: aguda, subaguda, subclínica, recidivante y crónica (Gotuzzo *et al.*, 1982; Salata *et al.*, 1985; WHO 1986). Por lo general, los pacientes con brucelosis crónica presentan malestar, nerviosismo, labilidad emocional, depresión y/o artromialgias generalizadas (Buzgan *et al.*, 2010). En nuestro estudio, la mayoría de los pacientes se quejaban de dolor en varias articulaciones, acompañado de astenia en el 54% de los casos. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Buzgan y cols. quienes describieron para una población de 140 pacientes con brucelosis crónica, que el 67,1% presentaba artralgias y el 62,1% tenía fatiga (Buzgan *et al.*, 2010). En dicho estudio, se observó además que el 28,6% de los pacientes presentaba enfermedad localizada. En nuestro estudio y coincidiendo con estos investigadores, la afección focal más frecuente fue la osteoarticular, que se presentó en el 60% de los pacientes, siendo la espondilitis la forma de presentación predominante. No obstante, se diagnosticaron otras complicaciones más raras como un absceso esplénico, un absceso hepático, una adenitis axilar derecha y una neuropatía motora multifocal.

Respecto al tratamiento antimicrobiano, no hay un protocolo estándar para la brucelosis crónica (Buzgan *et al.*, 2010). Durante la realización de este estudio, sólo once pacientes recibieron tratamiento antimicrobiano. El tipo de tratamiento y duración

del mismo varió según la presentación clínica y el criterio del médico responsable. Las pautas utilizadas fueron las que con frecuencia se usan en el tratamiento de la brucelosis aguda, que incluyen los antibióticos doxiciclina, rifampicina, estreptomycin y cotrimoxazol, solos o combinados (Solera, 2000).

### **UTILIDAD DEL ENSAYO DE PCRQtr Y DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS CLÁSICAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS CRÓNICA**

La sensibilidad y especificidad clínica son los dos criterios más importantes para valorar la utilidad de una prueba diagnóstica.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren la nula utilidad del hemocultivo en el diagnóstico de la brucelosis crónica. El hemocultivo, considerado el método de referencia para el diagnóstico de la brucelosis aguda, fue negativo en las 60 muestras analizadas. Únicamente se aisló *B. melitensis* a partir de una biopsia de médula ósea del paciente n° 10 intervenido de una espondilitis, material que por otra parte, fue positivo mediante el ensayo de PCRQtr.

En conjunto, el ensayo de PCRQtr mostró una sensibilidad del 100%, superior a la de las pruebas serológicas clásicas y a la de la prueba no convencional Brucellacapt<sup>®</sup>, tanto en pacientes con enfermedad focal como en aquellos que presentaban síntomas inespecíficos. El único caso en el que no se detectó ADN de *B. melitensis* en sangre y/o suero fue un paciente con artritis de rodilla que, sin embargo, presentó positividad en la muestra de líquido sinovial (LS). Otros dos estudios han probado sin éxito, la amplificación de ADN de *Brucella* spp. a partir de muestras de LS en pacientes con brucelosis aguda (Morata *et al.*, 2001; Queipo-Ortuño *et al.*, 2009). Por tanto, nuestro estudio podría ser el primero en el que se diagnostica una artritis de rodilla brucelar mediante un ensayo molecular

Si consideramos los pacientes con enfermedad focal y con síntomas inespecíficos por separado, encontramos que el ensayo de PCRQtr en sangre o suero fue similar en ambos grupos.

Respecto a los pacientes con síntomas inespecíficos, la sensibilidad del ensayo de PCRQtr fue del 75% para las muestras de sangre, del 50% para las muestras de suero y del 100% para ambas.

Hasta la fecha, sólo hay dos estudios que hayan valorado un ensayo molecular en pacientes con brucelosis crónica sin enfermedad focal (Al-Nakkas et al., 2005; Elfaki et al., 2005). En el estudio realizado por Al-Nakkas y cols. en 2005 se describe una sensibilidad del 89% para un ensayo de PCR convencional en muestras de sangre de 55 pacientes con brucelosis crónica. En el estudio realizado por Elfaki y cols. en 2005 se describe una sensibilidad del 100% para un ensayo de PCR convencional en muestras de suero de 12 pacientes con brucelosis crónica. En ambos estudios, los autores definen estos pacientes como aquellos que, tras un episodio de brucelosis aguda, presentan manifestaciones clínicas durante más de un año, sin embargo, no se especifica qué tipo de síntomas ni si previamente habían sido diagnosticados y/o tratados. La escasa información clínica proporcionada por estos autores así como el hecho de que en ambos trabajos se emplee un ensayo de PCR convencional hacen que estos elementos de discusión no sean del todo comparables a nuestros resultados, ni en lo referente a la técnica de amplificación del ADN bacteriano ni a la cohorte de estudio.

Otros tres estudios han testado un ensayo de PCRQtr para la detección de ADN de *Brucella* spp. en muestras de suero de pacientes con enfermedad focal en el episodio agudo (Debeaumont et al., 2005; Queipo-Ortuño et al., 2008; Surucuoglu et al., 2008). De estos estudios, sólo dos han separado los pacientes con y sin enfermedad focal para el cálculo de la sensibilidad y especificidad (Surucuoglu et al., 2009; Queipo-Ortuño et al., 2008). En dichos estudios se describe una sensibilidad del 89-100%, superior al 50% encontrado en nuestro estudio. Esta diferencia de sensibilidad podría deberse a que las muestras analizadas en estos estudios proceden de pacientes diagnosticados en el episodio inicial, con hemocultivos positivos en la mayoría de los casos.

En ausencia de un método de laboratorio de referencia (*gold standard*), a menudo se emplean las pruebas serológicas clásicas RB, SAT y Coombs, sin embargo, son pruebas que presentan baja sensibilidad y especificidad en pacientes con brucelosis crónica.

En este estudio, la prueba que mostró mayor sensibilidad fue la de Coombs con un 61%, seguida de las pruebas RB y Brucellacapt<sup>®</sup> con un 50% y de la prueba de SAT con un 11%. Las pruebas serológicas RB y SAT detectan anticuerpos aglutinantes IgM, IgG e IgA. La baja sensibilidad de estas pruebas en un paciente con sospecha clínica podría deberse a la presencia de anticuerpos no aglutinantes o incompletos en la muestra clínica que pueden inhibir la reacción de aglutinación (“efecto prozona”). El fenómeno prozona puede salvarse mediante la modificación del pH neutro en el que se suelen realizar estas pruebas. De hecho, se ha descrito que el pH ácido incrementa la capacidad aglutinante de los anticuerpos Ig G e IgA (Rubio *et al.*, 2001). Si tenemos en cuenta que tanto la prueba de RB como la prueba de SAT detectan el mismo tipo de anticuerpos, la notable diferencia de sensibilidad entre ambas podría deberse a las diferentes condiciones en que se realizaron las pruebas. Mientras que la prueba RB se llevó a cabo a pH ácido, la prueba de SAT se realizó a pH neutro. En un estudio reciente realizado en una serie de 140 pacientes con brucelosis crónica se ha descrito una sensibilidad de la prueba de SAT del 96%, muy superior a la encontrada en nuestro estudio (Buzgan *et al.*, 2010). Al igual que nosotros, estos autores clasifican a los pacientes crónicos como aquellos en los que los síntomas persisten durante más de un año, sin embargo, no especifican las condiciones técnicas en que se realizó dicha prueba.

Para la detección de los anticuerpos no aglutinantes se emplearon las pruebas de Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup>. La sensibilidad clínica de la prueba de Coombs fue superior a la de la prueba Brucellacapt<sup>®</sup> aunque de forma no significativa, tanto para los pacientes con síntomas inespecíficos como para los pacientes con enfermedad focal. Estos resultados no concuerdan con lo descrito en la literatura para el diagnóstico del episodio agudo, donde la mayoría de los autores coinciden en que la sensibilidad de la prueba de Coombs es igual o inferior a la del Brucellacapt<sup>®</sup> (Gómez *et al.*, 1999; Orduña *et al.*, 2000; Casao *et al.*, 2004). Se cree que la alta sensibilidad de la prueba Brucellacapt<sup>®</sup> es debida principalmente a las características del antígeno y a las condiciones de pH ácido en que se realiza, lo que favorece en gran medida la reacción de aglutinación (Casanova *et al.*, 2009). El único estudio en el que se ha comparado ambas pruebas en un grupo de pacientes con antecedentes de brucelosis es uno realizado por Serra y cols. en el que, al

igual que nosotros, los autores situaron la sensibilidad de la prueba de Coombs por encima del Brucellacapt<sup>®</sup>, aunque tampoco de forma significativa (Serra *et al.*, 2001).

Respecto a los títulos serológicos, está muy bien establecida la idea de que los anticuerpos aglutinantes se presentan a títulos inferiores que los no aglutinantes, tanto en las formas agudas como en estadíos avanzados de la enfermedad. En el presente estudio y para el caso de los pacientes con brucelosis crónica, la mediana del título de anticuerpos detectado mediante la prueba de Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup> fue, respectivamente, seis y cuatro veces superior al de la prueba de SAT; en ningún caso el título de anticuerpos del Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup> fue inferior al de la prueba de SAT. Cuando comparamos el título de anticuerpos detectado mediante las pruebas de Coombs y Brucellacapt<sup>®</sup>, encontramos diferencias sólo en el grupo de los pacientes con enfermedad focal (grupo A), donde la mediana del título registrado por la prueba de Coombs fue superior a la de la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup>. Recientemente se ha descrito que mientras que en una respuesta aguda, los títulos de anticuerpos detectados por ambas pruebas se incrementan por igual, los títulos de anticuerpos detectados mediante la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> descienden más rápidamente que los detectados mediante la prueba de Coombs, que se mantienen elevados durante años (Díaz *et al.*, 2006).

Otro aspecto importante de cualquier técnica diagnóstica es su especificidad, es decir, su capacidad de no producir resultados falsos positivos.

En nuestro estudio, la especificidad del ensayo de PCRQtr varió según se incluyeran o no los sujetos asintomáticos con antecedentes de brucelosis dentro del grupo control. Ninguna de las muestras procedentes de donantes sanos fue positiva para el ensayo de PCRQtr, sin embargo, en cinco casos (13%) (cuatro sujetos asintomáticos con antecedentes de brucelosis y un paciente con bacteremia por *Streptococcus pneumoniae*) se detectó ADN de *B. melitensis*. Este porcentaje de inespecificidad no parece excepcional. Otros estudios en los que se ha valorado distintos ensayos basados en la PCR han descrito un 3-12% de falsos positivos por presencia de ADN de *Brucella* spp. en sujetos con un episodio reciente de brucelosis, sujetos asintomáticos permanentemente expuestos a *Brucella* spp. o pacientes con otras enfermedades infecciosas causadas por *Escherichia coli* y *Streptococcus intermedius* (Al-Attas *et al.*,



2000; Al-Nakkas *et al.*, 2005; Maas *et al.*, 2007; Matar *et al.*, 1996; Morata *et al.*, 1999; Morata *et al.*, 2001; Morata *et al.*, 2003; Queipo-Ortuño *et al.*, 2005a; Queipo-Ortuño *et al.*, 2005b; Queipo-Ortuño *et al.*, 2008). El hecho de que los sujetos controles incluidos en nuestro estudio tuvieran más de una muestra positiva, obtenidas y procesadas en días distintos, después de haber tomado las medidas oportunas, sugiere que la contaminación es muy poco probable. Además, el amplificado obtenido del paciente que presentaba bacteremia por *S. pneumoniae* se secuenció, siendo 100% específico para *B. melitensis*. Si tenemos en cuenta que este paciente procedía de un medio rural y que mostró además un título serológico de 1/40 para la prueba Brucellacapt<sup>®</sup>, es posible que estuviera coinfectado con *B. melitensis*.

Respecto a la especificidad de las pruebas serológicas convencionales (RB, SAT y Coombs), todas fueron negativas en los 38 casos controles analizados. Sin embargo, la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> fue positiva en 15 sujetos (39%), diez sujetos asintomáticos con antecedentes de brucelosis, un donante sano, un sujeto sano expuesto a *Brucella* spp., un paciente con bacteremia por *Staphylococcus hominis*, un paciente con bacteremia por *Escherichia coli* y un paciente con bacteremia por *Streptococcus pneumoniae*. Se ha descrito que los anticuerpos IgG pueden estar presentes en muchos individuos sanos de áreas endémicas, o en individuos como ganaderos o veterinarios en los que su sistema inmunitario se encuentra repetidamente estimulado por contacto con *Brucella* spp. (Coghlan *et al.*, 1973). La mayoría de los autores consideran que, teniendo en cuenta que los niveles de anticuerpos IgG no aglutinantes se mantienen elevados tras la recuperación clínica del paciente, es difícil distinguir entre pacientes enfermos y sujetos sanos si atendemos sólo a estos parámetros (Almuneef y Memish, 2002; Ariza *et al.*, 1992; Gazapo *et al.*, 1989; Pellicer *et al.*, 1988). Sin embargo, todos estos trabajos presentan la limitación de un periodo de seguimiento de los pacientes limitado, que oscila entre los seis y los 36 meses. En el presente estudio, hemos podido comprobar, persistencia de anticuerpos IgG a títulos bajos más allá de tres años; sólo un sujeto perteneciente al grupo de asintomáticos con antecedentes de brucelosis presentó anticuerpos anti-*Brucella* a títulos  $\geq 1/160$ . En nuestro estudio, sólo tres de los diez sujetos asintomáticos con una historia previa de brucelosis que presentaban anticuerpos

anti-*Brucella* estaban expuestos a la enfermedad por contacto con ganado o consumo de productos lácteos sin pasteurizar.

Durante el periodo de seguimiento, que osciló entre uno y cuatro años, el título serológico inicialmente detectado se mantuvo constante en la mayoría de los pacientes. Sólo un paciente, el nº 1 con un absceso esplénico, mostró un descenso del título serológico detectado mediante la prueba de Brucellacapt® desde 1/5120 hasta 1/160. Probablemente este hecho se deba al tratamiento antimicrobiano que en este paciente fue especialmente prolongado. Estos resultados apoyan lo sugerido por algunos autores que insisten en el valor que tiene la persistencia de los anticuerpos no aglutinantes como marcador de la persistencia de infección en pacientes crónicos (Anderson *et al.*, 1964; Buchanan *et al.*, 1980; Reddin *et al.*, 1965). En 1980, Buchanan y cols., introdujeron la prueba de seroaglutinación con 2-mercaptoetanol para la detección de anticuerpos IgG no aglutinantes. Los autores observaron que después de un año de haber recibido un tratamiento antimicrobiano adecuado, el 9% de los pacientes permanecía con títulos serológicos elevados. De éstos pacientes, el 50% presentaba síntomas específicos y requería un nuevo tratamiento antimicrobiano.

## PACIENTES CON SEROLOGÍA NEGATIVA

Las muestras de dos pacientes con síntomas inespecíficos (11%) fueron negativas tanto para las pruebas de RB, SAT y Coombs como para la prueba de Brucellacapt®. De uno de estos pacientes enviamos cuatro muestras al Dr. Ramón Díaz, en el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario de Pamplona, para su análisis mediante pruebas serológicas complementarias. De acuerdo con nuestros resultados el RB fue negativo. Sin embargo, tanto la prueba de SAT como la de Coombs fueron positivas cuando se realizaron a pH ácido. Aunque el número de muestras contrastadas ha sido muy pequeño, los resultados sugieren que no se trata tanto de un fallo en la respuesta inmunitaria frente a *Brucella* spp. del paciente, sino más bien de un problema de sensibilidad de las pruebas serológicas clásicas evaluadas. En este sentido, se han descrito algunos casos de pacientes con brucelosis crónica o aguda con serología convencional negativa (Benito *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2001; Raptis *et al.*, 2007). A este nivel, la aparición de pruebas moleculares para la detección de ADN de *Brucella*

*spp.* parece importante. Existen experiencias similares fuera del campo de la brucelosis que indican que la presencia de ADN bacteriano en pacientes seronegativos podrían ser más frecuentes de lo habitual (Brown *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 1999). En un estudio realizado por Brown y cols. en 1995, los autores encontraron que el 69% de una cohorte de pacientes con leptospirosis fueron seronegativas y sin embargo se detectó ADN de *Leptospira spp.*

### **IDONEIDAD DEL TIPO DE MUESTRA PARA SU ANÁLISIS MEDIANTE EL ENSAYO DE PCRQtr**

Aunque se han empleado diversos tipos de muestras clínicas procedentes de pacientes con sospecha de brucelosis para su análisis mediante diferentes ensayos moleculares (Colmenero *et al.*, 2005; Navarro-Martínez *et al.*, 2008), las muestras de sangre y suero siguen siendo las más utilizadas.

Debido a que *Brucella spp.* sobrevive y se multiplica dentro de los fagocitos polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos, la sangre completa es la muestra de elección para muchos autores (Romero *et al.*, 1995; Matar *et al.*, 1996; Queipo-Ortuño *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha descrito que la muestra de sangre presenta la limitación de contener numerosos componentes naturales como la hemoglobina o sus productos de degradación, los iones calcio, el ADN de los leucocitos, la lactoferrina, la IgG, o componentes añadidos, como el EDTA o la heparina, que pueden inhibir la reacción de amplificación (Al-Soud *et al.*, 2000; Al-Soud y Rådström, 2001; Cogswell *et al.*, 1996; Morata *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2004; Queipo-Ortuño *et al.*, 2008). Por este motivo, algunos autores sugieren que la muestra de suero es más conveniente que la de sangre (Zerva *et al.*, 2001).

Hemos revisado la sensibilidad de los ensayos para detectar ADN de *Brucella spp.* en sangre y suero. Hasta la fecha sólo hay dos estudios que, en paralelo, hayan valorado un mismo ensayo molecular en ambos tipos de muestras (Zerva *et al.*, 2001; Vrioni *et al.*, 2004). En ambos estudios se evaluó un ensayo de PCR convencional a partir de muestras obtenidas de pacientes con brucelosis aguda. En el estudio realizado por Zerva y cols., la sensibilidad del ensayo fue del 94% para las muestras de suero y del 61% para las muestras de sangre completa. Sin embargo, los autores no mencionan

si esta diferencia fue estadísticamente significativa. Por el contrario, en el estudio realizado por Vrioni y cols., los autores comunicaron una sensibilidad próxima al 20% tanto para las muestras de sangre como para las de suero (Vrioni *et al.*, 2004). De acuerdo con Vrioni y cols., nosotros tampoco encontramos diferencias entre las muestras de sangre y suero.

Respecto a la cuantificación, hasta la fecha no hay estudios que hayan comparado la carga bacteriana en muestras de sangre y suero. En nuestro estudio, encontramos que la media de la carga bacteriana fue significativamente mayor en suero que en sangre tanto para las muestras procedentes del grupo de pacientes con enfermedad focal como para las muestras procedentes del grupo de pacientes con síntomas inespecíficos o cuando se consideraban las muestras de ambos grupos juntos. Esta diferencia en la cuantificación podría explicarse por diversos motivos. Por una parte, se ha descrito que durante el proceso de coagulación de la sangre para la obtención de la muestra de suero, la membrana de las células sanguíneas puede romperse (Steinman, 1975). Este hecho permitiría la liberación de las bacterias intracelulares al torrente sanguíneo con el consiguiente aumento de la probabilidad de detección del ADN bacteriano en suero. Por otra parte, se ha sugerido que el ADN circulante en las muestras de suero es un producto de la degradación del ADN de la bacteria. Si el ADN bacteriano en suero estuviera fragmentado se facilitaría la adhesión de los cebadores y de la enzima ADN *Taq* polimerasa al ADN diana y por tanto la amplificación y cuantificación del mismo. Además, como hemos mencionado anteriormente, el suero es un tipo de muestra que presenta la ventaja adicional de presentar menos factores potencialmente inhibidores de la reacción de amplificación que la sangre.

## **UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA**

Son escasos los estudios en los que se ha cuantificado el nivel de ADN de *Brucella* spp. en muestras clínicas (Debeaumont *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2006; Queipo-Ortuño *et al.*, 2008(a); Vrioni *et al.*, 2008).

Se ha postulado que la determinación de la carga bacteriana podría, en teoría, ser útil para la predicción de recidivas, determinar la severidad de la enfermedad, la necesidad de un nuevo tratamiento antimicrobiano, o para evaluar cómo y cuando el

patógeno se ha erradicado (Vrioni *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta la fecha ninguna de estas posibilidades se han comprobado. La mayoría de los estudios anteriormente citados, describen el nivel de ADN bacteriano en el diagnóstico del episodio agudo (Debeaumont *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2006).

En el presente estudio, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la carga bacteriana entre los pacientes con brucelosis crónica y los sujetos asintomáticos con antecedentes de brucelosis, tanto para las muestras de sangre como para las muestras de suero. Tampoco encontramos diferencias entre los pacientes con enfermedad focal y los pacientes con síntomas inespecíficos. Por lo tanto, atendiendo a estos resultados, parece que la determinación de la carga bacteriana carece de utilidad en la valoración de la severidad de la enfermedad.

Sólo hay un trabajo en el que se ha comparado la carga bacteriana entre un grupo de pacientes con brucelosis aguda y un grupo control, en el que se han incluido sujetos asintomáticos con una historia previa de brucelosis (Queipo-Ortuño *et al.*, 2009). En este estudio, los autores sugieren un punto de corte de  $5 \times 10^3$  copias/ml para la distinción entre brucelosis activa y brucelosis pasada. No podemos comparar la carga bacteriana cuantificada en los pacientes crónicos con la obtenida por estos autores, debido a que comparan el grupo de asintomáticos con un grupo de pacientes con brucelosis aguda. Además, se utilizan diferentes ensayos, curvas estándar y métodos de extracción de ADN y la cuantificación se expresa en distintas unidades. En un estudio anterior, nuestro grupo valoró el ensayo de PCRQtr descrito en el presente estudio para el diagnóstico de pacientes con brucelosis aguda (Navarro *et al.*, 2006). En dicho estudio, encontramos que la carga bacteriana media fue de  $10^3$  copias/ml, superior a la cuantificada en los pacientes con brucelosis crónica y los sujetos asintomáticos en los que se ha cuantificado del orden de  $10^2$  copias/ml. Probablemente, si comparáramos la carga bacteriana entre el grupo de pacientes agudos y el grupo de asintomáticos encontraríamos diferencias, de acuerdo a lo descrito por estos autores (Queipo y cols., 2008(a)).

De entre los estudios que han empleado ensayos de PCR convencional, algunos han descrito que la intensidad de la banda amplificada es más débil en pacientes

crónicos que en agudos (Nimri *et al.*, 2003; Shestopalov *et al.*, 1999; Zheludkov *et al.*, 2003). Otros estudios, sin embargo, describen que la intensidad de la señal es la misma tanto para los pacientes con brucelosis aguda como para los pacientes con brucelosis crónica (Elfaki *et al.*, 2005(a)).

Otra de las posibles aplicaciones de la determinación de la carga bacteriana es su utilidad en la respuesta al tratamiento. En el presente estudio, la carga bacteriana media descendió significativamente tras el tratamiento antimicrobiano, tanto en los pacientes con enfermedad focal como en los pacientes con síntomas inespecíficos. Sin embargo, este descenso en la carga bacteriana media no guardó relación con una buena evolución. El único paciente en el que se observó mejoría clínica con negativización del ensayo de PCRQtr fue el paciente nº 1 con un absceso esplénico que recibió tratamiento antimicrobiano durante más de un año. A la vista de estos resultados, se podría plantear la aplicación de tratamientos más prolongados, monitorizando la carga bacteriana y los títulos de anticuerpos frente a *Brucella* spp.

## **LIMITACIONES DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA BRUCELOSIS CRÓNICA**

Una de las características principales observadas en el presente estudio ha sido la detección intermitente del ADN de *B. melitensis*. La detección intermitente sugiere que la sensibilidad analítica del ensayo de PCRQtr se ve comprometida cuando la bacteria o su ADN están presentes a bajos niveles. Sin embargo, esto mismo ha sido observado por otros autores para el diagnóstico del episodio agudo cuando la carga bacteriana es mayor (Navarro *et al.*, 2006; Maas *et al.*, 2007).

Un paso crítico antes de la realización de cualquier ensayo de PCR convencional o en tiempo real es que el método de extracción de los ácidos nucleicos realice una lisis completa de la bacteria. En 1982, Moriyón y Berman observaron que la envoltura celular de *Brucella* spp. es más resistente que la de otras bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* a detergentes no iónicos, agentes utilizados por la mayoría de los métodos manuales de extracción de ácidos nucleicos actuales.

Tan importante como lo anterior es que el método de extracción proporcione un ADN puro, esto es, libre de componentes propios de la muestra o del mismo método que puedan inhibir la reacción de amplificación. Se han descrito numerosos componentes de la sangre como el grupo hemo de la hemoglobina, los iones calcio, el ADN de los leucocitos, la lactoferrina, la IgG o, componentes añadidos como el EDTA o la heparina que podrían inhibir la reacción de amplificación dando lugar a falsos negativos (Al-Soud *et al.*, 2000; Al-Soud y Rådström, 2001; Morata *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2004; Queipo-Ortuño *et al.*, 2008). Recientemente, Queipo-Ortuño y cols. han comparado siete de los *kits* de extracción de ADN más utilizados en el mercado (Queipo *et al.*, 2008b). Para ello inocularon muestras de suero con la cepa vacunal Rev-1 de *B. melitensis*. De entre todos los *kits* utilizados, el de MoBio, el mismo que se ha utilizado en el presente estudio, demostró ser el más eficiente, aportando el ADN más puro, el menor tiempo de ejecución, menor coste por muestra analizada y siendo el único en el que no se observó contaminación de los controles negativos de extracción (Queipo-Ortuño *et al.*, 2008b). Por otra parte, también es importante que la extracción del ADN se realice de forma adecuada. La mayoría de los *kits* comerciales utilizan etanol para precipitar los ácidos nucleicos. Si el etanol no se elimina correctamente, un exceso del mismo puede inhibir la reacción de amplificación (Espy *et al.*, 2006).

Como control de inhibición de la reacción de amplificación se recomienda el uso de controles internos positivos (IPC, de la terminología inglesa “*internal positive control*”), esto es, la adicción de una pareja de cebadores a la mezcla de reacción para la amplificación de una secuencia genómica altamente conservada. Hasta la fecha sólo un estudio relacionado con la detección de ADN *Brucella* spp. en muestras clínicas ha incluido un IPC a la mezcla de reacción (Vrioni *et al.*, 2008). Sin embargo, estos autores no detallan ni la secuencia amplificada ni los cebadores utilizados. Tampoco describen si hubo ausencia de amplificación de este control en las muestras evaluadas. Otros autores, en la evaluación de un ensayo de PCR convencional o en tiempo real sobre cultivo puro, han incluido como IPC la amplificación de ADN de *Campylobacter* spp. (Bogdanovich *et al.*, 2004; Lübeck *et al.*, 2003) o del bacteriófago  $\lambda$  (Al-Dahouk *et al.*, 2007). En un estudio anterior, nuestro grupo abordó la posibilidad de una inhibición de

la reacción de amplificación. Para ello, añadimos a la mezcla de reacción una pareja de cebadores específicos que amplifican una secuencia del gen k-ras humano (datos no mostrados). Las diez muestras de ADN evaluadas procedían de pacientes diagnosticados de brucelosis aguda que se encontraban en tratamiento antimicrobiano y que previamente habían sido positivas para el ensayo de PCRQtr. Observamos que hubo amplificación de la secuencia del gen humano en todas las muestras analizadas, sin embargo, la amplificación del ADN de *B. melitensis* no tuvo lugar en la mayoría de ellas. Estos resultados sugieren que no hay inhibición de la enzima ADN *Taq* polimerasa sino más bien que el ADN genómico humano interfiere en la reacción de amplificación (Navarro *et al.*, 2004) o que las cantidades pequeñas de ADN de *Brucella* spp. pueden no amplificarse incluso en los ensayos más sensibles. Se ha descrito que los dNTPs, el MgCl<sub>2</sub> y la enzima ADN *Taq* polimerasa pueden dirigirse a la amplificación del IPC (Navarro, 2009). En lo sucesivo desestimamos el uso de este IPC porque para la visualización del producto amplificado era necesario realizar un gel de agarosa lo que, además de suponer un riesgo de contaminación importante entre muestras, restaba rapidez y sencillez al ensayo de PCRQtr, razones principales de su utilización.

## **SIGNIFICADO DE LA PERSISTENCIA DE ADN DE *BRUCELLA MELITENSIS***

En nuestra serie de 38 sujetos con antecedentes de brucelosis se hace especial énfasis en un aspecto importante de la enfermedad como es la persistencia del ADN de *B. melitensis*, detectado y cuantificado mediante un ensayo de PCRtr. La principal limitación a la hora de interpretar estos resultados es la ausencia de un método de referencia para la detección directa del agente causal de la enfermedad con el que compararlos.

Los primeros autores que observaron, aunque de forma puntual, ADN de *Brucella* spp. en pacientes tras completar un tratamiento antimicrobiano, lo vincularon a recidivas (Morata *et al.*, 1999; Nimri *et al.*, 2003; Kattar *et al.*, 2007). Con posterioridad, nuestro grupo y otros demostramos que el ADN de *Brucella* spp. podía persistir tanto en pacientes sintomáticos como en sujetos asintomáticos hasta tres años después de la finalización del tratamiento antimicrobiano (Maas *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2006; Queipo-Ortuño *et al.*, 2008; Vrioni *et al.*, 2008).



Una de las aportaciones más relevantes del presente estudio ha sido demostrar que el ADN de *B. melitensis* puede persistir durante más de tres años, en algunos casos hasta más de 30, en ausencia de exposición a *Brucella* spp. La mayoría de los sujetos con antecedentes de brucelosis presentaron anticuerpos anti-*Brucella* fundamentalmente del tipo IgG. Esta persistencia en sí misma no permitiría diferenciar entre la actividad o la inactividad de la enfermedad. Otra cosa sería intentar establecer una relación entre la persistencia de estos anticuerpos y la presencia del ADN bacteriano. En nuestro estudio, los resultados del análisis de la relación entre la presencia de anticuerpos y el ADN de *B. melitensis* demuestran que existe una asociación entre ambas variables. Si los anticuerpos anti-*Brucella* y el ADN de *B. melitensis* detectados proceden de bacterias viables, inviables o latentes está por esclarecer. No obstante, parece que la presencia de ambos factores tiene un papel clínico relevante. Como veíamos, a excepción de un paciente con síntomas inespecíficos en el que no se pudo demostrar la presencia de anticuerpos anti-*Brucella*, el 94% de los pacientes en los que se detectó tanto ADN de *B. melitensis* como anticuerpos anti-*Brucella* presentaban síntomas y/o enfermedad focal frente a un 20% de los sujetos asintomáticos.

La amplificación de ADN circulante remanente en individuos asintomáticos tras la finalización del tratamiento antimicrobiano también se ha descrito en otras enfermedades infecciosas (Kami *et al.*, 2001; Hellyer *et al.*, 1996). Algunos autores han sugerido que el ADN procedente de bacterias muertas es rápidamente degradado por la actividad nucleolítica de enzimas presentes en los tejidos (Kain *et al.*, 1993; Malawista *et al.*, 1994; Nocton *et al.*, 1998). En un experimento realizado por Straubinger en 2000, se inyectó ADN de *Borrelia burgdorferi* muerta por calor en perros sanos. Mediante un ensayo de PCR se detectó ADN de la bacteria durante un máximo de tres semanas después de la inyección, por lo que los autores sugieren que durante una infección natural, el ADN bacteriano es rápida y completamente eliminado en pocos días (Straubinger, 2000). Sin embargo, un estudio reciente realizado en pacientes con una historia previa de Fiebre Q, sugiere que el ADN procedente de bacterias inviables no es completamente degradado y que persiste asociado a antígenos de la bacteria durante mucho tiempo (Marmion *et al.*, 2009). En este estudio, los autores tomaron muestras de médula ósea de pacientes con antecedentes de Fiebre Q que habían sido positivas para

la detección de ADN de *C. burnetti* y las inocularon en ratones sanos. Transcurridos 60 días desde la inoculación del homogeneizado, los ratones no mostraron evidencia de infección, sin embargo, fue posible detectar el antígeno bacteriano en el hígado y bazo de los mismos. A partir de estos resultados estos investigadores sugieren que el ADN bacteriano asociado a inmunocomplejos de LPS de la bacteria inviable es capaz de modular la respuesta inmunitaria en los pacientes.

Por otra parte, se ha descrito que las brucelas latentes inhiben el programa de apoptosis (Tolomeo *et al.*, 2003). Algunos autores han sugerido que la presencia de ADN de *Brucella* spp. en sujetos asintomáticos se debe a una respuesta inmunitaria capaz de eliminar la bacteria de forma eventual por reactivación de la apoptosis celular (Vrioni G *et al.*, 2008). Diversos estudios sugieren que existen distintas formas fenotípicas e incluso genotípicas de los microorganismos según causen infecciones agudas o crónicas. Se cree que las formas L, una variante de crecimiento bacteriano deficiente en pared celular, pueden permanecer de forma latente en el hospedador, y que, bajo ciertas condiciones, pueden revertir a sus formas originales y de esta manera producir la enfermedad (Díaz Corrales y Serrano, 2000). Son escasos los estudios en los que se ha investigado el papel de las formas L en *Brucella* spp. En 1976, Meyer demostró que la biovariedad 2 de *B. abortus* cambiaba a una forma L en placas de agar. Un estudio reciente realizado por Banai y cols. (2002), ha puesto de manifiesto que tras un tratamiento con progesterona aparecen *in vitro* formas L de *Brucella* spp. (Banai *et al.*, 2002). Atendiendo a estos resultados, las formas L explicarían la resistencia aparente de *Brucella* spp. y su persistencia en el hospedador.

En definitiva, se desconoce el significado de la persistencia de ADN de *B. melitensis* a largo plazo. En pacientes con enfermedad focal como una espondilitis o un absceso hepático, este ADN parece estar relacionado con la presencia de la bacteria en el tejido dañado. Sin embargo, en pacientes con síntomas inespecíficos en los que no hay evidencia de la localización de la bacteria, esta asociación es más difícil de establecer. En este tipo de pacientes, los síntomas podrían ser resultado directo de la presencia de la bacteria o secundarios a una respuesta inmunitaria prolongada como se ha sugerido para la infección causada por *Coxiella* spp. (Marmion *et al.*, 2006).

Respecto a los cuatro sujetos asintomáticos con antecedentes de brucelosis cuyas muestras fueron positivas para el ensayo de PCRQtr, tres de ellos habían estado en contacto con ganado caprino u ovino o habían ingerido productos lácteos sin pasteurizar durante la realización del estudio. Es probable que en estos sujetos, la presencia de ADN de *B. melitensis* se deba a la exposición a la bacteria. No obstante, no está claro el significado clínico de la persistencia de ADN bacteriano en ellos. Quizás en un futuro estos sujetos desarrollen síntomas o por el contrario, esa exposición a la bacteria les proteja a modo de vacuna. Este tipo de sujetos no se han descrito en la literatura por lo que parece apropiado realizar un seguimiento clínico y de laboratorio de los mismos más allá del realizado en el presente estudio.

## RECOMENDACIONES EN EL USO DEL ENSAYO DE PCRQtr

En la actualidad, existen varios *kits* comerciales para la detección y/o cuantificación de ADN de *Brucella* spp. en muestras clínicas de pacientes con brucelosis. Sin embargo, ninguno de estos ensayos se ha probado en estadíos avanzados de la enfermedad.

A la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos preguntarnos si es realmente útil y está justificada la utilización del ensayo de PCRQtr descrito en este estudio para el diagnóstico de la brucelosis crónica. Creemos que la respuesta a esta pregunta no debe ser categórica y que depende de los resultados obtenidos por otras pruebas diagnósticas y del ámbito en que se pretenda aplicar este ensayo molecular.

Creemos que el ensayo de PCRQtr empleado en este estudio puede suponer una ayuda importante, especialmente en aquellos pacientes que permanecen sin diagnosticar por los métodos tradicionales, bien porque presentan una respuesta inmunitaria débil o porque las condiciones de realización de las pruebas serológicas no son adecuadas y fallan en la detección de anticuerpos frente a *Brucella* spp.

Cualquier método diagnóstico aún siendo sensible y específico podría ver limitado su uso clínico si técnicamente fuera difícil de realizarlo, si consumiera excesivo tiempo

o fuera muy costoso. No es el caso del presente ensayo de PCRQtr en un ámbito hospitalario de un país desarrollado como el nuestro.

En el estudio de concordancia del ensayo de PCRQtr en sangre y suero realizado en el presente estudio, obtuvimos que la mayoría de las veces el ensayo de PCRQtr fue positivo sólo en un tipo de muestra y que esa diferencia de discordancia era significativa. Este hecho obliga a testar el ensayo de PCRQtr tanto en sangre como en suero para aumentar la probabilidad de detección del ADN de *B. melitensis*. En nuestra experiencia y en la de otros autores (Al-Dahouk *et al.*, 2007), la ausencia de amplificación de la secuencia diana en muestras clínicas, bien por la presencia de factores inhibidores o por otras razones ocurre frecuentemente con lo que sugerimos testar varias réplicas en paralelo del ADN extraído tanto en sangre como en suero para incrementar la probabilidad de un resultado positivo.

Si tenemos en cuenta que tanto la sensibilidad como la especificidad clínica superaron el 80% y que en la mayoría de los sujetos, el ADN de *B. melitensis* se detectó en la primera muestra de sangre y/o suero obtenida, es posible recomendar el empleo de nuestro ensayo de PCRQtr como herramienta diagnóstica complementaria.

## **FUTURAS INVESTIGACIONES**

Algunos de los pacientes incluidos en este estudio estaban diagnosticados de síndrome de fatiga crónica (SFC) y/o fibromialgia. El SFC se caracteriza por fatiga severa incapacitante, alteración del patrón normal del sueño, deterioro de memoria y concentración y dolor musculoesquelético. La causa del síndrome no se conoce y no existe un tratamiento efectivo por lo que la carga de sufrimiento y frustración de los pacientes y de los médicos que los atienden es considerable. Varios estudios lo han relacionado con alteraciones no específicas como la producción anormal de citoquinas o la reactivación de virus o de bacterias intracelulares como *Coxiella burnetii* o *Mycoplasma* spp. (Bassi *et al.*, 2008; Choppa *et al.*, 1998; Endresen, 2003; Marmion *et al.*, 2009; Nasralla *et al.*, 1999), sin embargo, el posible papel de *Brucella* spp. en dicho síndrome no se ha investigado.

En la actualidad, el diagnóstico de SFC se realiza de acuerdo a los criterios clínicos de Fukuda, que son los del Centro de Control de Enfermedades (CDC) y los que se utilizan en la valoración de los estudios más recientes (Fukuda *et al.*, 1994; Santhouse *et al.*, 2010). En el año 2000, De Merlier y cols. describieron una forma truncada de bajo peso molecular de 37 kDa de la ribonucleasa L (ARNasa L) en pacientes con SFC (De Merlier *et al.*, 2000). La ARNasa L es una enzima de 83kDa terminal de la vía antiviral de la 2-5A sintetasa/ARNasa L que desempeña un papel esencial en la eliminación de los ARN mensajeros víricos y celulares con la consiguiente inactivación de la síntesis de proteínas en las células infectadas. En el mencionado estudio, los autores encontraron presencia de la isoforma de la ARNasa L de bajo peso molecular en un 88% de los pacientes diagnosticados de SFC frente a un 28% de los sujetos controles (sujetos normales, con fibromialgia o depresión). Así, estos investigadores propusieron la proporción de las dos isoformas de la ARNasa L (37kDa/83kDa) como posible marcador bioquímico para separar pacientes con SFC de sujetos normales o de pacientes con fibromialgia y depresión. Aunque esta prueba ha sido recomendado por paneles de expertos no está disponible para la mayoría de los laboratorios.

La brucelosis crónica es una entidad que comparte clínica con el SFC. Sin embargo, hasta donde nosotros conocemos, anomalías en el metabolismo de la ARNasa L nunca se ha determinado en pacientes con brucelosis crónica. Nuestro grupo de investigación va a valorar si los pacientes con brucelosis crónica presentan una anomalía de la ARNasa L en la misma proporción que otros pacientes diagnosticados de SFC y si esta alteración no se encuentra en sujetos asintomáticos con antecedentes de brucelosis, correlacionando los resultados con la presencia de ADN de *B. melitensis* determinada mediante nuestro ensayo de PCRQtr. Esto permitiría disponer de una prueba de laboratorio diagnóstica para clasificar con mayor objetividad a los pacientes que realmente sufren esta entidad.



## **CONCLUSIONES**

---





Del trabajo expuesto en las páginas precedentes podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. La sensibilidad del ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (PCRQtr) para la detección de ADN de *Brucella melitensis* es superior si se aplica en muestras de sangre completa y suero que si se aplica sólo en un tipo de muestra.
2. Existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de ADN de *B. melitensis* detectada mediante el ensayo de PCRQtr y la presencia de anticuerpos frente a *Brucella* detectada por las pruebas serológicas Coombs anti-*Brucella* y Brucellacapt<sup>®</sup>.
3. La detección de ADN de *B. melitensis* mediante el ensayo de PCRQtr puede ser de utilidad clínica en el diagnóstico de la brucelosis crónica dado que la probabilidad de detección del mismo es superior en pacientes con enfermedad focal y pacientes con síntomas inespecíficos que en sujetos asintomáticos.
4. La determinación del número de copias de ADN de *B. melitensis* por mililitro de muestra clínica (carga bacteriana), sin embargo, no parece ser útil para distinguir entre los pacientes con enfermedad focal y los pacientes con síntomas inespecíficos.
5. El tratamiento antimicrobiano prolongado se mostró como el más eficaz en la resolución de los síntomas y la desaparición del ADN de *B. melitensis*. Cuando a los pacientes con brucelosis crónica se les administró un tratamiento antimicrobiano, el título de anticuerpos anti-*Brucella* no varió pero sí disminuyó la carga bacteriana determinada mediante el ensayo de PCRQtr.



**BIBLIOGRAFÍA**

---



## A

- Adone R, Ciuchini F, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M (2001) Use of polymerase chain reaction to identify *Brucella abortus* strain RB51 among *Brucella* field isolates from cattle in Italy. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 48:107-113.
- Agnew S, Spink WW (1949) The erythrocyte sedimentation rate in brucellosis. Am J Med Sci 217:211-214.
- Al-Attas RA, Al-Khalifa M, Al-Qurashi AR, Badawy M, Al-Gualy N (2000) Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. Ann Saudi Med 20:224-228.
- Al-Dahouk DS, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D (2003a) Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. Clin Lab 49:487-505.
- Al-Dahouk DS, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D (2003b) Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. Clin Lab 49:577-589.
- Al-Dahouk DS, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H (2004) The detection of *Brucella* spp. using PCR-ELISA and real-time PCR assays. Clin Lab 50:387-394.
- Al-Dahouk DS, Nockler K, Hensel A, Tomaso H, Scholz HC, Hagen RM, Neubauer H (2005) Human brucellosis in a nonendemic country: a report from Germany, 2002 and 2003. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24:450-456.
- Al-Dahouk DS, Nockler K, Scholz HC, Pfeffer M, Neubauer H, Tomaso H (2007) Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. Clin Chem Lab Med 45:1464-1470.
- Alişkan H, Colakoglu S, Turunc T, Demiroglu YZ, Yazic AC, Arslan H (2007) Evaluation of diagnostic value of Brucellacapt test in brucellosis. Mikrobiyol Bul 41:591-595.
- Almuneef M, Memish ZA (2002) Persistence of *Brucella* antibodies after successful treatment of acute brucellosis in an area of endemicity. J Clin Microbiol 40:2313.

- Al-Eissa YA, Assuhaimi SA, Al-Fawaz IM, Higgy KE, Al-Nasser MN, Al-Mobaireek KF (1993) Pancytopenia in children with brucellosis: clinical manifestations and bone marrow findings. *Acta Haematol* 89:132-136.
- Al-Kharfy TM (2001) Neonatal brucellosis and blood transfusion: case report and review of the literature. *Ann Trop Paediatr* 21:349-352.
- Al-Nakkas AF, Wright SG, Mustafa AS, Wilson S (2002) Single-tube, nested PCR for the diagnosis of human brucellosis in Kuwait. *Ann Trop Med Parasitol* 96(4):397-403.
- Al-Nakkas A, Mustafa AS, Wright SG (2005) Large-scale evaluation of a single-tube nested PCR for the laboratory diagnosis of human brucellosis in Kuwait. *J Med Microbiol* 54:727-730.
- Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P (2000) Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 38:345-350.
- Al-Soud WA, Rådström P (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *K Clin Microbiol* 39: 485-493.
- Alton GG, Jones LM, Pietz DE (1975) Laboratory techniques in brucellosis. Monogr Ser World Health Organ 1-163.
- Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK (2001) Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* 83:37-44.
- Anderson RK, Jennes R, Brumfield HP, Gough P (1964) *Brucella*-agglutinating antibodies: relation of mercaptoethanol stability to complement fixation. *Science* 143: 1344-1345.
- Anónimo 1. Boletín Epidemiológico Nacional (2009).
- Anónimo 2. Vigilancia de la brucelosis Castilla-La Mancha (2008) [www.jccm.es/sanidad/salud/epidemiologia](http://www.jccm.es/sanidad/salud/epidemiologia).
- Araj GF, Lulu AR, Mustafa MY, Khateeb MI (1986) Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. *J Hyg (Lond)* 97:457-469.
- Araj GF, Kaufmann AF (1989) Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA to *Brucella melitensis* major outer

- membrane proteins and whole-cell heat-killed antigens in sera of patients with brucellosis. *J Clin Microbiol* 27:1909-1912.
- Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyón I, Gorvel JP (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* 6: 618-625.
- Aréstegui M, Gualtieri S, Domínguez J, Scharowsky G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico (2001) *Rev Mex Cienc Vet.* 32:131-139.
- Ariza J. Brucelosis: Perspectiva actual de la enfermedad. Perfil de las inmunoglobulinas específicas en el curso de su evolución (1988) Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis doctoral.
- Ariza J, Servitje O, Pallares R, Fernández Viladrich P, Rufi G, Peyri J, Gudiol F (1989) Characteristic cutaneous lesions in patients with brucellosis. *Arch Dermatol*; 125:380-383.
- Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 14:131-140.
- Ariza J, Corredoira J, Pallares R, Viladrich PF, Rufi G, Pujol M, Gudiol F (1995) Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis* 20:1241-1249.
- Ariza J (1996) Brucellosis. *Curr Opin Microbiol* 126-131.
- Ariza J (2002) Brucelosis en el siglo XXI. *Med Clin (Barc)* 119:339-344.
- Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ, Falagas ME, Memish ZA, Roushan MR, Rubinstein E, Sipsas NV, Solera J, Young EJ, Pappas G (2007) Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PLoS Med* 4: e317.

## B

- Baddour MM, Alkhalifa DH (2008) Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Can J Microbiol* 54:352-357.
- Bang B (1897) The etiology of epizootic abortion. *J Comp Pathol Ther* 10:125-149.
- Baek BK, Lim CW, Rahman MS, Kim CH, Oluoch A, Kakoma I (2003) *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. *Can J Vet Res* 67:312-314.

- Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG (1992) Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J Trop Med Hyg 95:271-275.
- Banai M, Adams LG, Frey M, Pugh R, Ficht TA (2002) The myth of *Brucella* L-forms and possible involvement of *Brucella* penicillin binding proteins (PBPs) in pathogenicity. Vet Microbiol 90:263-279.
- Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht TA, Baum M, Banai M (2002) Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its *omp2* gene. J Clin Microbiol 40:1475-1480.
- Bashir R, Al-Kawi MZ, Harder EJ, Jinkins J (1985) Nervous system brucellosis: diagnosis and treatment. Neurology 35:1576-1581.
- Bassett-Smith PW (1903) Duration of Mediterranean Fever. British Medical Journal; p.1589.
- Bassi N, Amital D, Amital H, Doria A, Shoenfeld (2008) Chronic fatigue syndrome: characteristics and possible causes for its pathogenesis. Isr Med Assoc J 10:79-82.
- Belo AC, Grabowski EW, Zhang C, Longworth DL, Desilets DJ (2007) Case of chronic pancreatic brucellosis presenting as hemosuccus pancreaticus. JOP 8:429-432.
- Benito R, Estrella M, Gil J, Rubio MC (2001) Bacteremia por *Brucella* con serología convencional negativa. Enferm Infecc Microbiol Clin 7: 348-349.
- Berger TG, Guill MA, Goette DK (1981) Cutaneous lesions in brucellosis. Arch Dermatol; 117:40-42.
- Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet: 307-310.
- Bogdanovich T, Skurnik M, Lubeck PS, Ahrens P, Hoorfar J (2004) Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*. J Clin Microbiol 42:2261-2263.
- Bosch J, Linares J, Lopez de Goicoechea MJ, Ariza J, Cisnal MC, Martin R (1986) *In-vitro* activity of ciprofloxacin, ceftriaxone and five other antimicrobial agents against 95 strains of *Brucella melitensis*. J Antimicrob Chemother 17:459-461.



- Bosilkovski M, Krteva L, Dimzova M, Kondova I (2007) Brucellosis in 418 patients from the Balkan Peninsula: exposure-related differences in clinical manifestations laboratory test results and therapy outcome. *Int J Infect Dis*
- Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Chanoine M (1999) Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* 37: 925-930.
- Bounaadjia L, Albert D, Chenais B, Henault S, Zygmunt MS, Poliak S, Garin-Bastuji B (2009) Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Vet Microbiol* 137: 156-164.
- Boura P, Raptopoulou-Gigi M, Acriviadis E, Goulis G (1984) Reevaluation of the effect of levamisole in chronic brucellosis: in-vivo and in-vitro effect on monocyte phagocytosis. *J Immunopharmacol* 6: 135-146.
- Bouza E, Garcia DLT, Parras F, Guerrero A, Rodríguez-Creixems M, Gobernado J (1987) Brucellar meningitis. *Rev Infect Dis* 9:810-822.
- Bravo MJ, Colmenero JD, Alonso A, Caballero A (2003) HLA-B\*39 allele confers susceptibility to osteoarticular complications in human brucellosis. *J Rheumatol*; 30:1051-1053.
- Bricker BJ, Halling SM (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 32:2660-2666.
- Bricker BJ, Halling SM (1995) Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 33: 1640-1642.
- Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, Foster G, Brew S (2000) Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* 38:1258-1262.
- Bricker BJ (2002) PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 90:435-446.
- Briones-Lara E, Palacios-Saucedo GC, Martínez-Vázquez IO, Morales-Loredo A, Bilbao-Chavez LP (2007) Response to the treatment of brucellosis among children. Evaluation with Huddleson reaction and PCR. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 45: 615-622.

- Bruce D (1887) Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. Practitioner 39:161-170.
- Buchanan TM, Faber LC, Feldman RA (1974) Brucellosis in the United States, 1960-1972. An abattoir-associated disease. Part I. Clinical features and therapy. Medicine (Baltimore) 53:403-413.
- Buchanan TM, Faber LC (1980) 2-mercaptoethanol *Brucella* agglutination test: usefulness for predicting recovery from brucellosis. J Clin Microbiol 11:691-693.
- Bucher A, Gaustad P, Pape E (1990) Chronic neurobrucellosis due to *Brucella melitensis*. Scand J Infect Dis 22:223-226.
- Buddle MB (1956) Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. J Hyg (Lond) 54:351-364.
- Buzğan T, Karsen H, Karahocagil MK, Akdeniz H, Sunnetcioglu M (2007) A case of brucellosis presenting as high titer negative result by standard tube agglutination test. Mikrobiyol Bul 41:151-154.
- Buzğan T, Karahocagil MK, Irmak H, Baran AI, Karsen H, Evirgen O, Akdeniz H (2010) Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. Int J Infect Dis 14: e469-78.

## C

- Canning PC, Roth JA, Deyoe BL (1986) Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. J Infect Dis 154:464-470.
- Capasso L (2002) Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. J Infect 45:122-127.
- Carmichael LE, Kenney RM (1986) Canine abortion caused by *Brucella canis*. J Am Vet Med Assoc 152:605-616.
- Caron E, Peyrard T, Kohler S, Cabane S, Liautard JP, Dornand J (1994) Live *Brucella* spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. Infect Immun 62:5267-5274.
- Casañas MC, Queipo-Ortuño MI, Rodríguez-Torres A, Orduña A, Colmenero JD, Morata P (2001) Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20:127-131.

- Casanova A, Ariza J, Rubio M, Masuet C, Díaz R (2009) Brucellacapt versus classical tests in the serological diagnosis and management of human brucellosis. *Clin Vaccine Immunol* 16: 844-851.
- Casao MA, Smits HL, Navarro E, Solera J (2003) Clinical utility of a dipstick assay in patients with brucellosis: correlation with the period of evolution of the disease. *Clin Microbiol Infect* 9:301-305.
- Castañeda-Roldán EI, Avelino-Flores F, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Giron JA (2004) Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol* 6:435-445.
- Castaneda-Roldan EI, Ouahrani-Bettache S, Saldana Z, Avelino F, Rendon MA, Dornand J, Giron JA (2006) Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol* 8:1877-1887.
- Celebi G, Kūlah C, Kiliç S, Ustāndağ G (2007) Asymptomatic *Brucella* bacteremia and isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from human breast milk. *Scand J Infect Dis* 39: 205-208.
- Celli J (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* 2006 157:93-98.
- Cervantes F, Bruguera M, Carbonell J, Force L, Webb S (1982) Liver disease in brucellosis. A clinical and pathological study of 40 cases. *Postgrad Med J* 58:346-350.
- Cetinkaya B, Ongor H, Muz A, Ertas HB, Kalender H, Erdogan HM (1999) Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Vet Rec* 144:239-240.
- Chain PS, Commerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, Vergez LM, Aguero F, Land ML, Ugalde RA, Garcia E (2005) Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun* 73:8353-8361.
- Choppa PC, Vojdani A, Tagle C, Andrin R, Magtoto L (1998) Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome. *Mol Cell Probes* 12:301-308.

- Ciftçi C, Oztürk F, Oztekin A, Karaoğlu H, Saba R, Gültekin M, Mamikoğlu L (2005) Comparison of the serological tests used for the laboratory diagnosis of brucellosis. *Mikrobiyol Bul* 39:291-299.
- Cirak MY, Hizel K (2002) The value of polymerase chain reaction methods targeting two different gene regions for the diagnosis of brucellosis. *Mikrobiyol Bul* 36:271-276.
- Claraveau C, Wellemans V, Walravens K, Tryland M, Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Letesson JJ, Godfroid J (1998) Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology* 144:3267-3273.
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizacaino N (1996) Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett* 145:1-8.
- Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O (2000) An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:835-839.
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J (2001) Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect* 3:729-738.
- Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O (2002) Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. *Vaccine* 20:2546-2550.
- Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O, Boumedine KS (2003) Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect* 5:593-602.
- Cluff LE, Trever RW, Imboden JB, Canter A (1959) Brucellosis. II. Medical aspects of delayed convalescence. *AMA Arch Intern Med* 103:398-405.
- Coghlan JD, Longmore HJ (1973) The significance of *Brucella* antibodies in patients in a rural area. *Practitioner* 265: 645-652.
- Cogswell FB, Bantar CE, Hughes TG, Gu Y y Philipp MT (1996) Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 34: 980-982.

- Cohen J (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 20: 37-46.
- Colmenero JD, Porras JJ, Valdivielso P, Porras JA, de Ramón E, Cause M, Juárez C (1986) Brucellosis: a prospective study of 100 cases. *Med Clin (Barc.)* 86:43-48.
- Colmenero JD, Reguera JM, Cabrera FP, Hernández S, Porras J, Manchado P, Miranda MT (1989) Combined use of rose Bengal and indirect immunofluorescence in the diagnosis of brucellosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 7: 316-320.
- Colmenero JD, Reguera JM, Fernández-Nebro A, Cabrera-Franquelo F (1991) Osteoarticular complications of brucellosis. *Ann Rheum Dis* 50:23-26.
- Colmenero JD, Cisneros JM, Orjuela DL, Pachón J, García-Portales R, Rodríguez-Sampedro F, Juárez C (1992) Clinical course and prognosis of *Brucella* spondylitis. *Infection* 20:38-42.
- Colmenero JD, Fernández-Gallardo LC, Agundez JA, Seden J, Benitez J, Valverde E (1994) Possible implications of doxycycline-rifampin interaction for treatment of brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2798-2802.
- Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sánchez-De-Mora D, Delgado M, Cause M, Martín-Farfán A, Juárez C (1996) Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)* 75:195-211.
- Colmenero JD, Suárez-Muñoz MA, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Morata P (2002a) Late reactivation of calcified granuloma in a patient with chronic suppurative brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21:897-899.
- Colmenero JD, Queipo-Ortuño MI, María RJ, Ángel Suárez-Munoz M, Martín-Carballino S, Morata P (2002b) Chronic hepatosplenic abscesses in Brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42:159-167.
- Colmenero JD, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Baeza G, Salazar JA, Morata P (2005) Real time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1025-1027.
- Corbel MJ, Redwood DW (1984) Properties of an immunogenic fraction from *Brucella abortus* 45/20. *Dev Biol Stand* 56:159-168.
- Corbel MJ (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3:213-221.

- Cortez A, Scarcelli E, Soares RM, Heinemann MB, Sakamoto SM, Genovez ME, Ferreira F, Richtzenhain LJ (2001) Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetuses by polymerase chain reaction. Aust Vet J 79:500-501.
- Crasta OR, Folkert O, Fei Z, Mane SP, Evans C, Martino-Catt S, Bricker B, Yu G, Du L, Sobral BW (2008) Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. PLoS One; 3:e2193.
- Crosby E, Llosa L, Miro QM, Carrillo C, Gotuzzo E (1984) Hematologic changes in brucellosis. J Infect Dis 150:419-424.

## D

- Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiebaud M, Dubray G (1996) Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. J Appl Bacteriol 81:267-275.
- De Klerk E, Anderson R (1985) Comparative evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the laboratory diagnosis of brucellosis. J Clin Microbiol 21:381-386.
- De Ley J, Mannheim W, Segers P (1987) Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group. Int J Syst Bacteriol 37:35-42.
- Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M (2005) Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24: 842-845.
- DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc Natl Acad Sci U S A 99:443-448.
- De Meirleir K, Bisbal C, Campine I, De Becker P, Salehzada T, Demettre E, Lebleu B (2000). A 37 kDa 2-5A binding protein as a potential biochemical marker for chronic fatigue syndrome. Am J Med 108:99-105.

- Díaz Corrales FJ y Serrano JA (2000) Patogenicidad de las "Formas L" de *Nocardia*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*.
- Díaz R y Donorroso I (1971) Contribution to the serological diagnosis of brucellosis and yersiniosis. Use of the gel precipitation reaction. *Rev Clin Esp* 121:367-372.
- Díaz R (1974) Valor de la prueba de Rosa de Bengala y la demostración de anticuerpos anti-proteína de *Brucella* en el diagnóstico serológico de la brucellosis y yersiniosis. *Med Clin* 63:463.
- Díaz R, Maravi-Poma E, Rivero-Puente A (1976) Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *World Health Organization* 53:417-424.
- Díaz R, Maravi-Poma E, Fernández JL, García-Merlo S, Rivero-Puente A (1982) Brucellosis: study of 222 cases. Diagnosis of human brucellosis. *Rev Clin Esp* 166:107-110.
- Domingo S, Gastearena I, Vitas AI, Lopez-Goni I, Dios-Vieitez C, Diaz R, Gamazo C (1995) Comparative activity of azithromycin and doxycycline against *Brucella* spp. infection in mice. *J Antimicrob Chemother* 36: 647-656.
- Díaz R, Ariza J, Alberola I, Casanova A, Rubio MF (2006) Secondary serological response of patients with chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. *Clin Vaccine Immunol* 11:1190-1196.
- Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard JP (2002) The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol* 90:383-394.

## E

- Eisenschenk FC, Houle JJ, Hoffmann EM (1999) Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet Microbiol* 68:235-244.
- Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM (2005a) Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 53: 1-7.
- Elfaki MG, Al-Hokail AA, Nakeeb SM, Al-Rabiah FA (2005b) Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. *Med Sci Monit*.

- Elfaki MG, Al-Hokail AA (2009) Transforming growth factor beta production correlates with depressed lymphocytes function in humans with chronic brucellosis. *Microbes Infect* 11: 1089-1096.
- Endresen GK (2003) Mycoplasma blood infection in chronic fatigue and fibromyalgia syndromes. *Rheumatol Int* 23:211-215.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF (2006) *Clin Microbiol Rev* 19:165-256.
- Etemadi H, Raissadat A, Pickett MJ, Zafari Y, Vahedifar P (1984) Isolation of *Brucella* spp. from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 20:586.
- European Food Safety Authority (2006) The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005: *Brucella*. *The EFSA Journal* 94: 146-159.
- Evans AC (1918) Further studies on *Bacterium abortus* and related bacteria. A comparison of *Bacterium abortus* and *Bacterium bronchisepticus* and the microorganism which causes Malta fever. *J Infect Dis* 22:580-593.
- Evans AC (1961) Chronic brucellosis: the unreliability of diagnostic tests 1. *J Am Med Womens Assoc* 16:942-945.
- Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, Cummins DR, Miller WG (1994) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest* 6:448-452.

## F

- Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR (1990) Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 69:216-227.
- Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Stich RW (1992) Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol* 174:7778-7783.
- Fernández-Prada C, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle S, Schurig G, Hadfield T, Hoover D (2001) Deletion of *wboA* enhances activation of the



- lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Infect Immun 69, 4407-4416.
- Ferrao-Beck L, Cardoso R, Muñoz PM, de Miguel MJ, Albert D, Ferreira AC, Marín CM, Thiébaud M, Jacques I, Grayon M, Zygmunt MS, Garin-Bastuji B, Blasco JM, Sá MI (2006) Development of a multiplex PCR assay for polymorphism analysis of *Brucella suis* biovars causing brucellosis in swine. Vet Microbiol 115:269-277.
- Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Marquis H (1990) Genetic variation at the omp2 porin locus of the brucellae: species-specific markers. Mol Microbiol 4:1135-1142.
- Ficht TA, Hussein HS, Derr J, Bearden SW (1996) Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains. Int J Syst Bacteriol; 46:329-331.
- Foster G, Jahans KL, Reid RJ, Ross HM (1996) Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. Vet Rec 138:583-586
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol 57:2688-2693.
- Fox KF, Fox A, Nagpal M, Steinberg P, Heroux K (1998) Identification of *Brucella* by ribosomal-spacer-region PCR and differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp. pathogenic for humans by carbohydrate profiles. J Clin Microbiol 36: 3217-3222.
- Foz A, Garriga S (1954) Relation between complement fixation and incomplete antibodies (Coombs' test) in human brucellosis. Rev Immunol Ther Antimicrob 18:288-298.
- Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL (2007) Human brucellosis. Lancet Infect Dis 7:775-786.
- Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, Komaroff A (1994) The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. Ann Intern Med 121:953-959.

## G

- Gallien P, Dorn C, Alban G, Staak C, Protz D (1998) Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet Rec* 142: 512-514.
- Gandara B, Merino AL, Rogel MA, Martínez-Romero E (2001) Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 39:235-240.
- García-Rodríguez JA, García-Sánchez JE, Trujillano-Martín I, García-Sánchez E, García-García MI, Fresnadillo MJ (1994) Activity of BAY y 3118, a novel 4-quinolone, against *Brucella melitensis*. *J Chemother* 6: 102-106.
- García-Rodríguez JA, García Sánchez JE, Trujillano I, García SE, García-García MI, Fresnadillo MJ (1995) Susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to clinafloxacin and four other new fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1194-1195.
- García-Yoldi D, Marin CM, López-Goñi I (2005) Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *FEMS Microbiol Lett* 245:79-84.
- García-Yoldi D, Marín CM, De Miguel MJ, Muñoz PM, Vizmanos JL, López-Goñi I (2006) Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem* 52:779-781.
- Gazapo E, González-Lahoz J, Subiza JL, Baquero M, Gil J, de al Concha EG (1989) Changes in IgM and IgG antibodies concentrations in brucellosis over time: importance for diagnosis and follow-up. *J Infect Dis* 159: 219-225.
- Gee JE, De BK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T (2004) Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. *J Clin Microbiol* 42:3649-3654.
- Giannelli A (1959) Contribution to the study of neurobrucellosis. Para-infective hemiparkinsonism with chronic development. *Riv Patol Nerv Ment* 80:1135-1152.
- Godfroid J (2002) Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech* 21:277-286.
- Goldbaum FA, Rubbi CP, Wallach JC, Miguel SE, Baldi PC, Fosatti CA (1992) Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune responses. *J Clin Microbiol* 30:604-607.

- Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H (2001) Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect* 3:43-48.
- Gómez MC, Rosa C, Geijo P, Escibano MA (1999) Comparative study of the Brucellacapt test versus the Coombs test for *Brucella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 17:283-285.
- Gómez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P, Escibano MA, Muñoz A, López C (2008) Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. *Clin Vaccine Immunol* 15:1031-1033.
- Gopaul KK, Koylass MS, Smith CJ, Whatmore AM (2008) Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiol* 8: 86.
- Gorvel JP, Moreno E (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 90:281-297.
- Gotuzzo E, Alarcón GS, Bocanegra TS, Carrillo C, Guerra JC, Rolando I, Espinoza LR (1982) Articular involvement in human brucellosis: a retrospective analysis of 304 cases. *Semin Arthritis Rheum* 12:245-255.
- Gotuzzo E, Carrillo C, Guerra J, Llosa L (1986) An evaluation of diagnostic methods for brucellosis--the value of bone marrow culture. *J Infect Dis* 153:122-125.
- Grave W, Sturm AW (1983) Brucellosis associated with a beauty parlour. *Lancet* 1:1326-1327.
- Guarino A, Serpe L, Fusco G, Scaramuzzo A, Gallo P (2000) Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. *Vet Rec* 147: 634-636.
- Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckert A, Garin J, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E, López-Goñi I (2002) The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12375-12380.

## H

- Halling SM, Tatum SM, Tatum FM, Bricker BJ (1993) Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene* 133:123-127.

- Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol 187:2715-2726.
- Hamdy ME, Amins AS (2002) Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J 163:299-305.
- Hellyer TJ, Fletcher TW, Bates JH, Stead WW, Templeton GL, Cave MD, Eisenach KD (1996) Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. J Infect Dis 173:934-941.
- Henderson RJ, Hill DM (1972) Subclinical *Brucella* infection in man. Br Med J 3:154-156.
- Herman L, De Ridder H (1992) Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 58:2099-2101.
- Hernández-Castro R, Verdugo-Rodríguez A, Puente JL, Suárez-Guemes F (2008) The BMEI0216 gene of *Brucella melitensis* is required for internalization in HeLa cells. Microb Pathog 44:28-33.
- Horrocks (1905) Preliminary note on goats as a means of propagation of Mediterranean fever. Reports of the MFC Pt III: 84-90.
- Hoyer BH, McCullough NB (1968) Homologies of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, canine abortion organisms, and other *Brucella* species. J Bacteriol 96:1783-1790.
- <http://patric.vbi.vt.edu>.
- Hubalek Z, Scholz HC, Sedlacek I, Melzer F, Sanogo YO, Nesvadbova J (2007) Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). Vector Borne Zoonotic Dis 7:679-687.
- Hughes ML (1897) Mediterranean, Malta or Undulant Fever. McMillan, London.

## I

- Imboden JB, Canter A, Cluff LE, Trever RW (1959) Brucellosis. III. Psychologic aspects of delayed convalescence. AMA Arch Intern Med 103:406-414.

**J**

- Jahans KL, Foster G, Broughton ES (1997) The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* 57:373-382.
- Jiang X, Leonard B, Benson R, Baldwin CL (1993) Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol* 151:309-319.
- Jubier-Maurin V, Boigegrain RA, Cloeckaert A, Gross A, Alvarez-Martínez MT, Terraza A, Liautard J, Köhler S, Rouot B, Dornand J, Liautard JP (2001) Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infect Immun* 69:4823-4830.
- Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, Ramuz M, Allardet-Servent (1998a) Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the *Proteobacteria*. *J Bacteriol* 180:2749-2755.
- Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M (1998b) Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 27:99-106.

**K**

- Kain KC, Brown AE, Lanar DE, Ballou WR, Webster HK (1993) Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 49:478-484.
- Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, Kanda Y, Kashima T, Yamazaki Y, Hamaki T, Mori S, Akiyama H, Mutou Y, Sakamaki H, Osumi K, Kimura S, Hirai H (2001) Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 33:1504-1512.
- Kawamura S, Maesaki S, Noda T, Hirakata Y, Tomono K, Tashiro T, Kohno S (1999) Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 37:218-220.
- Kaplan G, Weinstein DE, Steinman RM (1985) An analysis of in vitro T cell responsiveness in lepromatous leprosy. *J Exp Med* 162: 917-929.

- Kattar MM, Zalloua PA, Araj GF, Samaha-Kfoury J, Shbaklo H, Kanj SS, Khalife S, Deeb M (2007) Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59: 23-32.
- Keid LB, Soares RM, Vieira NR, Megid J, Salgado VR, Vasconcellos SA, da CM, Gregori F, Richtzenhain LJ (2007) Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. *Vet Res Commun* 31: 951-965.
- Khorvash F, Keshteli AH, Behjati M, Salehi M, Emami NA (2007) An unusual presentation of brucellosis, involving multiple organ systems, with low agglutinating titers: a case report. *J Med Case Reports* 1: 53.
- Kim S, Lee DS, Suzuki H, Watarai M (2006) Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by multiplex nested PCR. *J Vet Med Sci* 68:615-618.
- Kinikli S, Turkcapar N, Kucukay MB, Keskin G, Kinikli G (2005) In vitro nonspecific mitogenic response of T-cell subsets in acute and chronic brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 52:229-233.

## L

- Lapaque N, Moriyón I, Moreno E, Gorvel JP (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* 8:60-66.
- Landau Z, Green L (1999) Chronic brucellosis in workers in a meat-packing plant. *Scand J Infect Dis* 31: 511-512.
- Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Leal-Klevezas DS, López-Merino A, Martínez-Soriano JP (1995a) Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. *Arch Med Res* 26: 263-267.
- Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A, Martínez-Soriano JP (1995b) Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 33: 3087-3090.

- Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, García-Cantu J, López-Merino A, Martínez-Soriano JP (2000) Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Vet Microbiol* 75: 91-97.
- Le Flèche FP, Jacques I, Grayon M (2006) Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol*; 6:9.
- Leyla G, Kadri G, Umran O (2003) Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet Microbiol* 93: 53-61.
- López-Goñi I, Guzmán I, Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Moriyón I, Moreno E (2002) Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol* 90:329-339.
- López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira AC, Cardoso R, Correa de Sa MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B (2008) Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol* 46: 3484-3487.
- Lübeck PS, Skurnik M, Ahrens P, Hoorfar J (2003) A multiplex PCR-detection assay for *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 and *Brucella* spp. based on the perosamine synthetase gene. Application to *Brucella* diagnostics. *Adv Exp Med Biol* 529: 451-453.
- Lulu AR, Araj GF, Khateeb MI, Mustafa MY, Yusuf AR, Fenech FF (1988) Human brucellosis in Kuwait: a prospective study of 400 cases. *Q J Med* 66:39-54.

## M

- Maas KS, Mendez M, Zavaleta M, Manrique J, Franco MP, Mulder M, Bonifacio N, Castañeda ML, Chacaltana J, Yagui E, Gilman RH, Guillen A, Blazes DL, Espinosa B, Hall E, Abdoel TH, Smits HL (2007) Evaluation of brucellosis by PCR and persistence after treatment in patients returning to the hospital for follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 76: 698-702.
- Magee JT (1980) An enzyme-labelled immunosorbent assay for *Brucella abortus* antibodies. *J Med Microbiol* 13(1):167-172.
- Malawista SE, Barthold SW, Persing DH (1994) Fate of *Borrelia burgdorferi* DNA in tissues of infected mice after antibiotic treatment. *J Infect Dis.* 170:1312-1316.

- Mantecón MA, Gutiérrez MP, Zarzosa MP, Fernández-Lago L, Colmenero JD, Vizcaíno N, Bratos MA, Almaraz A, Cubero A, Muñoz MF, Torres AR, Orduña A (2008) Influence of brucellosis history on serological diagnosis and evolution of patients with acute brucellosis. *J of Infect* 57: 397-403.
- Manterola L, Tejero-Garcés A, Ficapal A, Shopayeva G, Blasco JM, Marín CM, López-Goñi I (2003) Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet Microbiol* 92: 65-72.
- Mantur BG, Mangalgi SS, Mulimani M (1996) *Brucella melitensis*--a sexually transmissible agent?. *Lancet* 347:1763.
- Mantur BG, Biradar MS, Bidri RC, Mulimani MS, Veerappa, Kariholu P, Patil SB, Mangalgi SS (2006) Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area. *J Med Microbiol* 55:897-903.
- Marbach F, Saïah L, Fischer JF, Huismans J, Cometta A (2007) Infection of a total knee prosthesis with *Brucella* spp. *Rev Med Suisse* 3: 1007-1009.
- Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R (2006) Molecular characterization of the rpoB gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping. *Microbes Infect* 8:860-865.
- Marmion BP, Sukocheva O, Storm PA, Lockhart M, Turra M, Kok T, Ayres J, Routledge H, Graves S (2009) Q fever: persistence of antigenic non-viable cell residues of *Coxiella burnetii* in the host--implications for post Q fever infection fatigue syndrome and other chronic sequelae. *102:673-684*.
- Marston JA (1861) Report on fever (Malta). Army Medical Department Report 186:486-521.
- Martín Moreno S, Guinea Esquerdo L, Carrero González P, Visedo Orden R, García Carbajosa S, Calvo del Olmo T, Reverte Cejudo D (1992) Diagnosis of brucellosis in an endemic area. Evaluation of routine diagnostic tests. *Med Clin* 98: 481-485.
- Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM (1996) Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J Clin Microbiol* 34: 477-478.



- Matsiota-Bernard P, Waser S, Vrioni G (2000) Detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. Clin Microbiol Infect. 2000 6:223-225.
- Mercier E, Jumas-Bilak E, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, Ramuz M (1996) Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA element. J Clin Microbiol 34:1299-1302.
- Meyer KF, Shaw EB (1920) A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle. Studies on the genus *Brucella* nov. gen. J Infect Dis 173-184.
- Meyer ME (1976) Evolution and taxonomy in the genus *Brucella*: concepts on the origins of the contemporary species. Am J Vet Res 37:199-202.
- Michaux S, Paillisson J, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Allardet-Servent A, Ramuz M (1993) Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. J Bacteriol 175:701-705.
- Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A (2007) Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. J Clin Microbiol 45: 1211-1218.
- Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, Rea TH, Bloom BR (1988) Learning from lesions: patterns of tissue in leprosy. Proc Natl Acad Sci USA 85: 1213-1217.
- Mohler JR (1913) Infectious abortion of cattle. Annual Report US Bureau Animal Industry 30.
- Molinero LM (2001) Medidas de concordancia para variables cualitativas.
- Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, López-Goñi I, Blasco JM, Cloeckert A, Moriyón I (2003) Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. Infect Immun 71:3261-3271.
- Morata P, Queipo-Ortuño MI y Colmenero JD (1998) Strategy for Optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis 36: 2443-2446.

- Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Pichardo C, Colmenero JD (1999) Posttreatment follow-up of brucellosis by PCR assay. *J Clin Microbiol* 37: 4163-4166.
- Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Miralles F, López-González JJ, Colmenero JD (2001) Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J Clin Microbiol*. 39:3743-3746.
- Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Cardenas A, Colmenero JD (2003) Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 41: 144-148.
- Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *J Bacteriol* 172:3569-3576.
- Moreno E, Moriyón I (2002) *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1-3.
- Moriyón I, López-Goñi I (1998) Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol* 1:19-26.
- Moriyón I, Berman DT (1982) Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J Bacteriol*. 152:822-828.
- Mousa AR, Koshy TS, Araj GF, Marafie AA, Muhtaseb SA, Al-Mudallal DS, Busharetulla MS (1986) *Brucella* meningitis: presentation, diagnosis and treatment--a prospective study of ten cases. *Q J Med* 60:873-885.
- Mousa AR, Muhtaseb SA, Almudallal DS, Khodeir SM, Marafie AA (1987) Osteoarticular complications of brucellosis: a study of 169 cases. *Rev Infect Dis* 9:531-543.
- Mousa AR, Elhag KM, Khogali M, Marafie AA (1988) The nature of human brucellosis in Kuwait: study of 379 cases. *Rev Infect Dis* 10: 211-217.

## N

- Naparstek E, Block CS, Slavin S (1982) Transmission of brucellosis by bone marrow transplantation. *Lancet* 1:574-575.

- Nasralla M, Haier J, Nicolson GL (1999) Multiple mycoplasmal infections detected in blood of patients with chronic fatigue syndrome and/or fibromyalgia syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 18:859-865.
- Navarro E, Fernández JA, Escribano J, Solera J (1999) PCR Assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 37: 1654-1655.
- Navarro E, Escribano J, Fernández J, Solera J (2002) Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34: 147-151.
- Navarro E, Casao MA, Solera J (2004) Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 4:115-123.
- Navarro E, Segura JC, Castaño MJ, Solera J (2006) Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. *Clin Infect Dis* 42: 1266-1273.
- Navarro E (2009) Desarrollo de un sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación del número de copias de ADN de *Brucella melitensis* en sangre de pacientes con brucelosis. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Tesis doctoral.
- Navarro-Martínez A, Navarro E, Castaño MJ, Solera J (2008) Rapid diagnosis of human brucellosis by quantitative real-time PCR: a case report of brucellar spondylitis. *J Clin Microbiol* 46: 385-387.
- Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF (2003) Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays. *Appl Environ Microbiol* 69: 4753-4759.
- Nicoletti P (2002) A short history of brucellosis. *Vet Microbiol* 90:5-9.
- Nimri LF (2003) Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. *BMC Infect Dis* 3: 5.
- Nocton JJ, Bloom BJ, Rutledge BJ, Persing DH, Logigian EL, Schmid CH, Steere AC (1996) Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis*. 174:623-627.

## O

- OCampo-Sosa AA, Aguero-Balbin J, García-Lobo JM (2005) Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet Microbiol* 110:41-51.
- OCampo-Sosa AA, García-Lobo JM (2008) Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol* 8:17.
- Orduña A, Almaraz A, Prado A, Gutierrez MP, García-Pascual A, Dueñas A, Cuervo M, Abad R, Hernández B, Lorenzo B, Bratos MA, Torres AR (2000) Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 38:4000-4005.
- Ortega M, Lara A, Pérez MJ, Díaz V, Ruiz A, Rodríguez M (2001) Bacteremia caused by *Brucella* spp. with negative conventional serology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19:34.
- Otero JR, Fuertes A, Palenque E, Noriega A (1982) Microtiter-Adapted method that facilitates the Coombs test for brucellosis. *J Clin Microbiol* 16:737-738.
- Ouahrani S, Michaux S, Sri Widada J, Bourg G, Tournebize R, Ramuz M, Liautard JP (1993) Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J Gen Microbiol*. 139:3265-3273.

## P

- Palanduz A, Palanduz S, Guler K, Guler N (2000) Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *Int J Infect Dis* 4:55-56.
- Pappas G, Bosilkovski M, Akritidis N, Mastora M, Krteva L, Tsianos E (2003) Brucellosis and the respiratory system. *Clin Infect Dis* 37:95-99.
- Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianor E (2005) Brucellosis. *N Engl J Med* 352:2325-2336.
- Park KW, Kim DM, Park CY, Kim HL, Jang SJ, Choi YS, Park MY, Song HJ y Lee SH (2007) Fatal systemic infection with multifocal liver and lung nodules caused by *Brucella abortus* *Am J Trop Med Hyg*; 77: 1120-1123.
- Parma AE, Santisteban G, Margni RA (1984) Analysis and in vivo assay of *B. abortus* agglutinating and non-agglutinating antibodies. *Vet Microbiol* 9:391-398.

- Parratt D, Nielsen KH, White RG (1977) Radioimmunoassay of IgM, IgG, and IgA *Brucella* antibodies. *Lancet*. 1:1075-1078.
- Pascual J, Combarros O, Polo JM, Berciano J (1988) Localized CNS brucellosis: report of 7 cases. *Acta Neurol Scand* 78:282-289.
- Paulsen IT, Seshadri R, Nelson E, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13148-13153.
- Peled N, David Y, Yagupsky P (2004) Bartholin's gland abscess caused by *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol* 42:917-918.
- Pellicer T, Ariza J, Foz A, Pallarés R, Gudiol F (1988) Specific antibodies detected during relapses of human brucellosis. *J Infect Dis* 157:918-924.
- Perry MB, Bundle DR (1990) Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. *Infect Immun* 58:1391-1395.
- Pontow SE, Kery V, Stahl PD (1992) Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 137:221-244.
- Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP (2003) Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* 71:1481-1490.
- Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH (2004) Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 42: 1290-1293.
- Purwar S, Metgud SC, Darshan A, Mutnal MB, Nagmoti MB (2006) Infective endocarditis due to brucella. *Indian J Med Microbiol* 24: 286-288.

## Q

- Queipo-Ortuño MI, Morata P, Ocón P, Manchado P, Colmenero JD (1997) Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 35: 2927-2930.

- Queipo-Ortuño MI. Desarrollo y valoración de la eficacia diagnóstica de una prueba de PCR en la brucelosis humana. Universidad de Málaga. Tesis doctoral 1998.
- Queipo-Ortuño MI, García-Ordoñez MA, Gil R, Rojas J, De Dios CJ, Morata P (2004) PCR-DIG ELISA with biotinylated primers is unsuitable for use in whole blood samples from patients with brucellosis. *Mol Cell Probes* 18: 243-250.
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Pachón ME, Gonzalez M, Morata P (2005a) Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect* 11: 713-718.
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P (2005b) Comparison between LightCycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 40: 260-264.
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Muñoz N, Baeza G, Clavijo E, Morata P (2006) Rapid diagnosis of *Brucella* epididymo-orchitis by real-time polymerase chain reaction assay in urine samples. *J Urol* 176:2290-2293.
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Bravo MJ, García-Ordoñez MA, Morata P (2008a) Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis. *Clin Microbiol Infect* 14: 1128-1134.
- Queipo-Ortuño MI, Tena F, Colmenero JD, Morata P (2008b) Comparison of seven commercial DNA extraction kit for the recovery of *Brucella* DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 27: 109-114.
- Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Bermudez P, Bravo MJ, Morata P (2009) Rapid differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis using a multiplex real-time PCR assay. *PLoS One* 4: 4526.

## R

- Raptis L, Pappas G, Akritidis N (2007) A cutaneous cyst caused by brucellosis with a negative serological test. *Int J Infect Dis*. 11:82-83.

- Ratushna VG, Sturgill DM, Ramamoorthy S, Reichow SA, He Y, Lathigra R, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM, Gibas CJ (2006) Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. BMC Microbiol 6:13.
- Reddin JL, Anderson RK, Jenness R, Spink WW (1965) Significance of 7S and macroglobulin *Brucella* agglutinins in human brucellosis N Engl J Med. 272:1263-1268.
- Redkar R, Rose S, Bricker B, DelVecchio V (2001) Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. Mol Cell Probes 15: 43-52.
- Reguera JM, Alarcón A, Miralles F, Pachón J, Juárez C, Colmenero JD (2003) Brucella endocarditis: clinical, diagnostic, and therapeutic approach. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22:647-650.
- Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Soares RM, Sakamoto SM, Vasconcellos SA, Higa ZM, Scarcelli E, Genovez ME (2002) A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. Vet Microbiol 87: 139-147.
- Rigby CE, Frase AD (1989) Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. Can J Vet Res 53:326-330.
- Rijpens NP, Jannes G, Van Asbroeck M, Rossau R, Herman LM (1996) Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. Appl Environ Microbiol 62:1683-1688.
- Rittig MG, Álvarez-Martínez MT, Porte F, Liautard JP, Rouot B (2001) Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosome. Infect Immun 69:3995-4006.
- Rodríguez-Zapata M, Salmerón I, Manzano L, Salmerón OJ, Prieto A, Álvarez-Mon M (1996) Defective interferon-gamma production by T-lymphocytes from patients with acute brucellosis. Eur J Clin Invest 26:136-140.
- Rolando I, Vilchez G, Olarte L, Lluncor M, Carrillo C, Paris M, Guerra H, Gotuzzo E (2009) Brucellar uveitis: intraocular fluids and biopsy studies. Int J Infect Dis 13:206-211.
- Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I (1995a) Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol 33:615-617.

- Romero C, Pardo M, Grilló MJ, Díaz R, Blasco JM, Lopez-Goñi I (1995b) Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J Clin Microbiol* 33: 3198-3200.
- Ross HM, Foster G, Reid RJ, Jahans L, MacMillan AP (1994) *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet Rec* 134:359.
- Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J (1991) Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet* 337:14-15.
- Rubio M, Barrio B, Díaz R (2001) Usefulness of Rose Bengal, Coombs and counter-immunoelectrophoresis for the diagnosis of human brucellosis cases with negative seroagglutination. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19:406-407.

## S

- Salata RA, Ravdin JI (1985) *Brucella* species (Brucellosis). Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE, ed. *Principies and Practice of Infectious Diseases*. New York. John Wiley and Sons, 1283-1290.
- Sangari FJ, Agüero J (1994) Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus 14. 12:435-438.
- Santhouse AM, Hotopf M, David AS (2010). Chronic fatigue syndrome. *BMJ* 11;340:c738.
- Scholz HC, Pfeffer M, Witte A, Neubauer H, Al DS, Wernery U, Tomaso H (2008) Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the recA gene. *J Med Microbiol* 57: 64-71.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Göllner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nöckler K (2008) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58 :375-382.
- Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al-Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK (2010) *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:801-808.



- Serra AJ, Godoy GP (2000) Incidence, etiology and epidemiology of brucellosis in a rural area of the province of Lleida. *Rev Esp Salud Publica* 74:45-53.
- Serra J, Velasco J, Godoy P, Mendoza J (2001) Can the Brucellacapt test be substituted for the Coombs test in the diagnosis of human brucellosis?. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19:202-205.
- Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzzo A, Fenizia D (1999) Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. *J Dairy Res* 66: 313-317.
- Shestopalov MI, Kalinovskii AI, Balakhonov SV, Kapustin I, Golubinskii EP (1999) Analysis of PCR-diagnosis of brucellosis in human. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 12-17.
- Sifuentes-Rincón AM, Revol A, Barrera-Saldana HA (1997) Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Mol Med* 3: 734-739.
- Skalsky K, Yahav D, Bishara J, Pitlik S, Leibovici L, Paul M (2008) Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 336: 701-704.
- Skendros P, Boura P, Chrisagis D, Raptopoulou-Gigi M (2007) Diminished percentage of CD4+ T-lymphocytes expressing interleukine-2 receptor alpha in chronic brucellosis. *J Infect* 54:192-197.
- Smits HL, Basahi MA, Díaz R, Marrodán T, Douglas JT, Rocha A, Veerman J, Zheludkov MM, Witte OW, de Jong J, Gussenhoven GC, Goris MG, van Der Hoorn MA (1999) Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *J Clin Microbiol* 37: 4179-4182.
- Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R (2003) Immunochromatographic *Brucella*-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:1141-1146.
- Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S, Barathur RR (2000) A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol* 38: 2602-2610.

- Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC (2003) Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis* 9: 485-488.
- Sola-Landa A, Pizarro-Cerda J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López-Goñi I (1998) A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 29:125-138.
- Solera J, Medrano F, Rodríguez M, Geijo P, Paulino J (1991) A comparative therapeutic and multicenter trial of rifampicin and doxycycline versus streptomycin and doxycycline in human brucellosis. *Med Clin (Barc)* 96:649-653.
- Solera J, Martínez-Alfaro E, Saez L (1994) Meta-analysis of the efficacy of the combination of +rifampicin and doxycycline in the treatment of human brucellosis. *Med Clin (Barc)* 102: 731-738.
- Solera J, Rodríguez-Zapata M, Geijo P, Largo J, Paulino J, Sáez L, Martínez-Alfaro E, Sánchez L, Sepúlveda MA, Ruiz-Ribo MD (1995) Doxycycline-rifampin versus doxycycline-streptomycin in treatment of human brucellosis due to *Brucella melitensis*. The GECMEI Group. Grupo de Estudio de Castilla-la Mancha de Enfermedades Infecciosas. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2061-2067.
- Solera J, Espinosa A, Geijo P, Martínez-Alfaro E, Sáez L, Sepúlveda MA, Ruiz-Ribó MD (1996) Treatment of human brucellosis with netilmicin and doxycycline. *Clin Infect Dis* 22:441-445.
- Solera J, Martínez-Alfaro E, Espinosa A (1997) Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs* 53: 245-256.
- Solera J, Martínez-Alfaro E, Espinosa A, Castillejos ML, Geijo P, Rodríguez-Zapata M (1998) Multivariate model for predicting relapse in human brucellosis. *J Infect* 36:85-92.
- Solera J, Lozano E, Martínez-Alfaro E, Espinosa A, Castillejos ML, Abad L (1999) Brucellar spondylitis: review of 35 cases and literature survey. *Clin Infect Dis* 29:1440-1449.
- Solera J (2000) Treatment of human brucellosis. *J Med Liban* 48: 255-263.

- Solera J, Castaño MJ (2008) Brucellosis. International Encyclopedia of Public Health 357-369.
- Spink WW, Magoffin RL (1950) Clinical course of human brucellosis in Minnesota. Third Inter-American Congress on Brucellosis. Washington D.C. Pan American San. Bur.; p.94.
- Spink WW (1951) What is chronic brucellosis?. Ann Intern Med 35:358-374.
- Spink WW (1954) Family studies on brucellosis. Am J Med Sci 222: 127-140.
- Spink WW (1956) The nature of human brucellosis. University of Minnesota Press.
- Spink WW, Bradley GM (1960) Persistent parasitism in experimental brucellosis: attempts to eliminate brucellae with long-term tetracycline therapy. J Lab Clin Med 55:535-547.
- Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S, Barathur RR (2000) A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. J Clin Microbiol 38: 2602-2610.
- Stantic-Pavlinic M, Cec V, Mehle J (1983) Brucellosis in spouses and the possibility of interhuman infection. Infection 11:313-314.
- Starr T, NG TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J (2008) *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. Traffic 9:678-694.
- Steinman CR (1975) Free DNA in serum and plasma from normal adults. J Clin Invest 56: 512-515.
- Stoenner HG, Lackman DB (1957) A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. Am J Vet Res 18:947-951.
- Straubinger RK (2000) PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. J Clin Microbiol. 38:2191-2199.
- Sunmez S, Cagatay A, Karadeniz A, Ozsut H, Eraksoy H, Calangu S (2006) A case of acute hepatitis due to brucellosis. South Med J 99: 632-633.
- Surucuoglu S, El S, Ural S, Gazi H, Kurutepe S, Taskiran P, Yurtsever SG (2009) Evaluation of real-time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations. Pol J Microbiol 58: 15-19.

Swets, J. A. (1986). Indices of discrimination or diagnostic accuracy: Their ROCs and implied models. *Psychological Bulletin*, 99: 100-117.

## T

Takahashi H, Tanaka S, Yoshida K, Hoshino H, Sasaki H, Takahashi K, Kimura K, Fujii N, Kimura H, Mori M, Abe S (1996) An unusual case of brucellosis in Japan: difficulties in the differential diagnosis from pulmonary tuberculosis. *Intern Med* 35: 310-314.

Tantillo G, Di PA, Vergara A, Buonavoglia C (2001) Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. *J Food Prot* 64: 164-167.

Tantillo GM, Di PA, Buonavoglia C (2003) Detection of *Brucella* spp. in soft cheese by semi-nested polymerase chain reaction. *J Dairy Res* 70: 245-247.

Tekkok IH, Berker M, Ozcan OE, Ozgen T, Akalin E (1993) Brucellosis of the spine. *Neurosurgery* 33:838-844.

Theegarten D, Albrecht S, Totsch M, Teschler H, Neubauer H, Al DS (2008) Brucellosis of the lung: case report and review of the literature. *Virchows Arch* 452: 97-101.

Thornes RD (1977) The anergy of chronic human brucellosis. *Ir Med J* 70:480-483.

Tolomeo M, Di Carlo P, Abbadessa V, Titone L, Miceli S, Barbusca E, Cannizzo G, Mancuso S, Arista S, Scarlata F (2003) Monocyte and lymphocyte apoptosis resistance in acute and chronic brucellosis and its possible implications in clinical management. *Clin Infect Dis*. 2003 36:1533-1538.

## V

Vassallo DJ (1996) The saga of brucellosis: controversy over credit for linking Malta Fever with goats' milk. *The Lancet* 348:804-808.

Velasco J, Romero C, López-Goñi I, Leiva J, Díaz R, Moriyón I (1998) Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int J Syst Bacteriol* 48:759-768.

Verger JM, Grimont F, Grimont PA, Grayon M (1987) Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 138:235-238.

- Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Lefevre M, Ageron E, Grimont F (2000) Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping. *Res Microbiol* 151:797-799.
- Vizcaíno N, Cloeckaert A, Verger J, Grayon M, Fernández-Lago L (2000) DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect* 2:1089-1100.
- Vrioni G, Gartzonika C, Kostoula A, Boboyianni C, Papadopoulou C, Levidiotou S (2004) Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 194-199.
- Vrioni G, Pappas G, Priavali E, Gartzonika C, Levidiotou S (2008) An eternal microbe: *Brucella* DNA load persists for years after clinical cure. *Clin Infect Dis* 46:131-136.

## W

- Watarai M, Makino S, Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T (2002) Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* 4:341-355.
- Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S, Young E, Cutler SJ, MacMillan AP (2005) Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J Clin Microbiol* 43:761-769.
- Whatmore AM, Shankster SJ, Perrett LL, Murphy TJ, Brew SD, Thirlwall RE, Cutler SJ, MacMillan AP (2006) Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 44:1982-1993.
- Whatmore AM, Perrett LL, Macmillan AP (2007) Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol* 7: 34.
- WHO (1986) Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Sixth Report. WHO Technical Report Series N° 740, Geneva, Switzerland 56-57.
- Williams B (1982) Brucellosis. *Practitioner* 226:1507-1517.
- [www. the-icsp.org](http://www.the-icsp.org)
- Wyatt HV (1996) *Brucella melitensis* can be transmitted sexually?. *Lancet* 348:615.

## Y

- Young EJ, Gómez CI, Yawn DH, Musher DM (1979) Comparison of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* infections of mice and their effect on acquired cellular resistance. *Infect Immun* 26:680-685.
- Young EJ (1983) Human brucellosis. *Rev Infect Dis* 5:821-842.
- Young EJ, Borchert M, Kretzer FL, Musher DM (1985) Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis* 151:682-690.
- Young EJ (1991) Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev Infect Dis* 13:359-372.
- Young E, Corbel MJ (1995) *Brucellosis: Clinical and laboratory aspects*. CRC Press.
- Young EJ (1995) An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 21:283-289.

## Z

- Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ (2001) Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol* 39: 1661-1664.
- Zinemman HH, Seal US, Hall WH (1964) Some molecular characteristics of blocking antibodies in human brucellosis. Soluble antigen-antibody complexes *J Immunol* 93:993-1000.
- Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis* (1995) *Infect Immun* 63: 3231-3233.

## **ANEXOS**

---





## ABREVIATURAS

3´	Extremo 3´ del ADN
5´	Extremo 5´ del ADN
5X	Cinco veces concentrado
a. C.	antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMOS-PCR	PCR para la detección de ADN de <i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. ovis</i> y <i>B. suis</i> .
AP-PCR	PCR al azar/ <i>arbitrarily primer</i> -PCR
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosina-5´-trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bv	biovariedad
BvrS/BvrR	Sensor y regulador relacionado con la virulencia de <i>Brucella</i> spp./ <i>Brucella virulence related Sensor and Regulator</i>
C	Complemento
CHUA	Complejo Hospitalario Universitario de Albacete
CEIC	Comité de Ética de Investigación Clínica
CMV	Citomegalovirus
CP	Cociente de probabilidad
cols.	colaboradores
Coombs	Coombs anti- <i>Brucella</i>
Ct	ciclo umbral/ <i>threshold cycle</i>
DM II	diabetes mellitus tipo 2
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
ELISA	enzimoinmunoanálisis/ <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>Et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros)
Fc	Fragmento cristalizante
GC	guanina-citosina
GGT	Gamma-glutamyl transpeptidasa
GOT	Glutámico oxalacético transaminasa
GPT	Glutámico pirúvico transaminasa
GTPasas	Guanosina trifosfatasas
HLA-27	antígeno leucocitario humano B-27
HTA	hipertensión arterial
IDR	inmunodifusión radial
IFN- $\gamma$	interferón gamma
Ig	inmunoglobulina
IL	interleuquina
i.m.	intramuscular
i.v.	intravenoso
LCR	líquido cefalorraquídeo

LS	líquido sinovial
LPS	lipopolisacárido
M	mujer
MO	médula ósea
nt	nucleótido
Omp	proteína de membrana externa/ <i>outer membrane protein</i>
pb	pares de bases
pct.	paciente
PBS	solución de fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa/ <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCRtr	PCR en tiempo real
PCRQtr	PCR cuantitativa en tiempo real
Pm	peso molecular
+	positivo
®	marca registrada (ingl.: <i>registered trademark</i> )
RAPD-PCR	PCR de polimorfismos amplificados al azar/ <i>random amplified polymorphism-PCR</i>
RB	Rosa de Bengala
RE	retículo endoplásmico
REP-PCR	PCR de secuencias palindrómicas repetitivas extragénicas/ <i>repetitive extragenic palindromic sequences-PCR</i>
RMN	resonancia magnética nuclear
RFLP-PCR	PCR de polimorfismos de fragmentos de restricción/ <i>restriction fragment length polymorphism-PCR</i>
ROIs	intermediarios reactivos de oxígeno/ <i>reactive oxygen intermediates</i>
SAT	seroaglutinación en tubo
SMZ	Sulfametoxazol
SP41	Proteína de superficie <i>Brucella</i> spp./ <i>Surface Protein 41</i>
TAC	tomografía axial computarizada
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TMP	Trimetoprima
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Trihidroximetilaminometano
T <sub>m</sub>	temperatura de fusión
V	varón
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VNTR	Repeticiones en tándem de número variable/ <i>variable number tandem repeats</i>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Sensibilidad y especificidad de diversos estudios basados en ensayos de PCR convencional aplicados en muestras de sangre y suero de pacientes con brucelosis.....	54
<b>Tabla 2.</b> Ensayos de PCRtr para la detección y/o cuantificación de ADN de <i>Brucella</i> spp.....	56
<b>Tabla 3.</b> Sensibilidad y especificidad de diversos estudios de ensayos basados en la técnica de PCRtr aplicados en muestras de sangre o suero de pacientes con brucelosis.....	57
<b>Tabla 4.</b> Tratamiento de la brucelosis humana (Solera, 2000). .....	59
<b>Tabla 5.</b> Número de muestras analizadas y pruebas realizadas. ....	71
<b>Tabla 6.</b> Características de los cebadores y de la sonda TaqMan. ....	78
<b>Tabla 7.</b> Especies de <i>Brucella</i> y bacterias relacionadas genéticamente testadas.....	80
<b>Tabla 8.</b> Grado de acuerdo en función del índice kappa (Landis y Koch, 1977).....	89
<b>Tabla 9.</b> Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad. ....	90
<b>Tabla 10.</b> Características demográficas, clínicas y resultados del ensayo de PCRQtr y de las pruebas serológicas convencionales de los ocho sujetos excluidos del estudio. ....	96
<b>Tabla 11.</b> Antecedentes epidemiológicos de los pacientes con enfermedad focal (grupo A). ....	98
<b>Tabla 12.</b> Características demográficas y clínicas de los pacientes con enfermedad focal (grupo A). ....	99
<b>Tabla 13.</b> Tipo y duración del tratamiento de los pacientes con enfermedad focal (grupo A). ....	100
<b>Tabla 14.</b> Resultado de las pruebas serológicas y del ensayo de PCRQtr de los pacientes con enfermedad focal (grupo A) a la entrada en el estudio.....	102
<b>Tabla 15.</b> Antecedentes epidemiológicos de los pacientes con síntomas inespecíficos (grupo B). ....	104
<b>Tabla 16.</b> Características demográficas y clínicas de los pacientes con síntomas inespecíficos (grupo B). ....	105

<b>Tabla 17.</b> Tipo y duración del tratamiento antimicrobiano de los pacientes con síntomas inespecíficos (grupo B).....	106
<b>Tabla 18.</b> Resultado de las pruebas serológicas y la PCRQtr de los pacientes con síntomas inespecíficos (grupo B) a la entrada en el estudio. ....	107
<b>Tabla 19.</b> Antecedentes epidemiológicos de los sujetos asintomáticos (grupo C). ....	109
<b>Tabla 20.</b> Características demográficas y clínicas de los sujetos asintomáticos (grupo C).....	110
<b>Tabla 21.</b> Resultado de las pruebas serológicas y del ensayo de PCRQtr de los 11 sujetos asintomáticos con serología y/o PCRQtr positiva a la entrada en el estudio.....	111
<b>Tabla 22.</b> Sensibilidad, especificidad, CP + y CP- del ensayo de PCRQtr, las pruebas serológicas convencionales y el Brucellacapt® a la entrada en el estudio. ....	114
<b>Tabla 23.</b> Porcentaje de muestras positivas para las pruebas RB, SAT, Coombs, Brucellacapt® y PCRQtr de pacientes con brucelosis crónica (grupos A y B). ....	114
<b>Tabla 24.</b> Porcentaje de muestras positivas para el ensayo de PCRQtr y carga bacteriana según el grupo de estudio (A, B o C) y tipo de muestra (sangre o suero).....	115
<b>Tabla 25.</b> Mediana (mínimo-máximo) de las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt®. .	122
<b>Tabla 26.</b> Resultados del análisis de la curva COR de las pruebas SAT, Coombs y Brucellacapt® .....	123
<b>Tabla 27.</b> Puntos de corte y sensibilidad y especificidad asociadas del SAT, Coombs y Brucellacapt®. ....	125
<b>Tabla 28.</b> Relación entre la presencia de anticuerpos anti- <i>Brucella</i> y la presencia de ADN de <i>B. melitensis</i> . ....	126
<b>Tabla 29.</b> Relación entre presentar anticuerpos anti- <i>Brucella</i> a títulos $\geq 1/320$ y la presencia de ADN de <i>B. melitensis</i> . ....	126
<b>Tabla 30.</b> Comparación de los resultados de las pruebas serológicas realizadas por el Servicio de Microbiología del CHUA y los laboratorios Vircell S.L.....	127

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Casos declarados de brucelosis humana en España y Castilla-La Mancha durante el periodo 2000-2009.....	23
<b>Figura 2.</b> Estructura del LPS de <i>Brucella</i> spp.....	27
<b>Figura 3.</b> Tráfico intracelular de <i>Brucella</i> spp.....	34
<b>Figura 4.</b> Interpretación visual de los resultados de las pruebas Rosa de Bengala (izquierda) y Brucellacapt® (derecha).....	75
<b>Figura 5.</b> Esquema del funcionamiento de la sonda TaqMan.....	79
<b>Figura 6.</b> Curva externa estándar.....	85
<b>Figura 7.</b> Curva COR.....	92
<b>Figura 8.</b> Evolución de la carga bacteriana en los seis pacientes con enfermedad focal que completaron el tratamiento antimicrobiano.....	116
<b>Figura 9.</b> Evolución de la carga bacteriana en los cinco pacientes con síntomas inespecíficos que completaron el tratamiento antimicrobiano.....	118
<b>Figura 10.</b> Comparación de la carga bacteriana media en sangre y suero.....	121
<b>Figura 11.</b> Curva COR de las pruebas SAT, Coombs anti- <i>Brucella</i> y Brucellacapt®..	123



## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS SUJETOS

A continuación se expone una descripción detallada de la historia clínica, de las pruebas realizadas y la evolución clínica de los sujetos con antecedentes de brucelosis.

### PACIENTES CON ENFERMEDAD FOCAL (GRUPO A)

#### Paciente n° 1

Varón de 66 años de edad, agricultor, bebedor de 120 g de alcohol al día, portador de una prótesis en cadera izquierda, con antecedentes de DM tipo II en tratamiento con acarbosa 100 mg/8 h y glimepirina 2 mg/24 h. Tuvo su primer episodio de brucelosis en 1998, que contrajo por consumo de productos lácteos sin pasteurizar y se diagnosticó mediante clínica compatible y serología para *Brucella* spp.

En enero de 2005 consultó el Servicio de Medicina Interna por presentar un cuadro de astenia, anorexia, sensación distérmica no termometrada, escalofríos y dolor en el cuadrante superior izquierdo. En los exámenes de laboratorio, el paciente presentó elevación de las transaminasas (GOT 158 u/l (valor normal 5-31 u/l), GPT 250 u/l (valor normal 5-31 u/l), GGT 269 u/l (9-35 u/l)), elevación de la proteína C reactiva 124,5 mg/l (valor normal 0-5 mg/l) y de la ferritina 2132 ng/ml (valor normal 30-400 ng/ml) junto con leucopenia y trombopenia. La ecografía y el TAC de abdomen revelaron un absceso esplénico con núcleos de calcificación de aproximadamente 3 cm de diámetro (Figura 1).



**Figura 1.** Tomografía axial computerizada abdominal del paciente n° 1. Señalado con una flecha se observa un absceso esplénico brucelar de aproximadamente tres centímetros de diámetro, calcificado y con un halo lipodenso.

La serología para *Brucella* spp. fue positiva para las pruebas RB, SAT (1/1280) y Coombs (1/5120). La prueba Brucellacapt<sup>®</sup> mostró un título de 1/5120. El hemocultivo fue negativo y con el diagnóstico de absceso esplénico brucelar inició tratamiento antimicrobiano con doxiciclina 100 mg/12 h durante 60 días y estreptomicina 1 g/24 h durante 15 días, con mejoría clínica. Transcurridos 20 días, a la doxiciclina, se sumaron primero, rifampicina 900 mg/24 h i.m. y después, cotrimoxazol (TMP 160 mg/12 h y SMZ 800mg/12 h) hasta completar nueve meses de tratamiento. En ese momento, el paciente desarrolló un exantema y un aumento de las enzimas hepáticas que se normalizaron tras la retirada de la rifampicina y el cotrimoxazol. Continuó el tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante seis meses más con resolución de las molestias en el hipocondrio izquierdo. Fue diagnosticado de polimialgia reumática por debilidad y dolor de cinturas escapular y pelviana y tratado con una pauta descendiente de corticoides con desaparición de la clínica. Durante el periodo de seguimiento de este paciente (Abril 2005-Octubre 2009), se obtuvieron 61 muestras (31 de sangre y 30 de suero).

En la Tabla 31 se muestran los resultados del hemocultivo, las pruebas serológicas clásicas, la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> y el ensayo de PCRQtr antes, durante y después del tratamiento antimicrobiano. Una vez finalizado el tratamiento, el paciente se siguió durante tres años, periodo en el que no se detectaron recidivas y las lesiones esplénicas permanecieron estables. Tras el tratamiento, la única muestra positiva para el ensayo de PCRQtr se obtuvo a los cinco meses de finalizar el mismo. Durante los restantes dos años y medio de seguimiento post-tratamiento, se analizaron 20 muestras más (10 de sangre y 10 de suero), que resultaron todas negativas para la presencia de ADN de *B. melitensis*. En la actualidad el paciente se encuentra asintomático.



**Tabla 1.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt® y PCRQtr del paciente n° 1 antes, durante y después del tratamiento antimicrobiano.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
Hemocultivo <sup>a</sup>	0/2		0/4		ND	
RB <sup>a</sup>	2/2		14/14		4/14	
SAT <sup>b</sup> (rango) <sup>d</sup>	1/2 (80-1280)		4/10 (80-1280)		0/11 (20-80)	
Coombs <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	2/2 (2560-5120)		10/10 (1280-5120)		10/10 (640-2560)	
Brucellacapt <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	2/2 (320-5120)		13/13 (320-5120)		7/14 (160-320)	
	Sangre	Suero	Sangre	Suero	Sangre	Suero
PCRQtr <sup>a</sup> (media ± DE)	1/2 (6)	0/2 (0)	7/15 (457 ± 506)	1/14 (156)	0/14 (0)	1/14 (1602)

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/160$ ; <sup>c</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/320$ ; <sup>d</sup> Títulos recíprocos; ND: no hay datos.

## Paciente n° 2

Varón de 51 años de edad, matarife, actualmente trabaja como inspector de comercio. Diagnosticado de brucelosis en 1978 mediante clínica compatible y serología positiva para *Brucella* spp., contrajo la enfermedad por consumo de productos lácteos sin pasteurizar y contacto con productos animales. Desde entonces presenta dolor en cadera derecha que controla con indometacina 75 mg/24 h. Tiene antecedentes de hipertensión, dislipemia, depresión y glaucoma. En Abril de 2005 comenzó con dolores en ambas caderas por lo que se le realizó un exámen radiológico en el que se informó de posible sacroileitis bilateral con predominio derecho. El tipaje serológico para el antígeno HLA-27 fue positivo. La serología para VHB, VHC, VIH, *Coxiella* spp. y *Rickettsia* spp. fue negativa. La serología para *Brucella* spp. fue positiva para las pruebas RB, Coombs (1/1280) y Brucellacapt® (1/80). El ensayo de PCRQtr fue positivo en sangre y suero con 271 copias/ml y 154 copias/ml, respectivamente. El paciente fue diagnosticado de posible coxitis brucelar e inició tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h y rifampicina 600 mg/24 h durante tres meses sin mejoría del dolor.

Durante el periodo de seguimiento del paciente (Agosto 2005-Marzo 2009), se analizaron 26 muestras (13 de sangre y 13 de suero). En la Tabla 32 se muestran los resultados del hemocultivo, serología convencional, la prueba Brucellacapt® y el ensayo de PCRQtr antes, durante y después del tratamiento antimicrobiano. En el último año de seguimiento post-tratamiento se analizaron ocho muestras (cuatro de sangre y cuatro de suero). Una de las cuatro muestras de sangre fue positiva para el ensayo de PCRQtr, cuantificándose 55 copias/ml. En la actualidad, el paciente continúa con dolor en cadera derecha.

**Tabla 2.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt® y PCRQtr del paciente n° 2 antes, durante y después del tratamiento antimicrobiano.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
Hemocultivo <sup>a</sup>	0/1		ND		ND	
RB <sup>a</sup>	2/3		0/2		0/7	
SAT <sup>b</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/3		0/2		0/6	
Coombs <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	1/3 (0-1280)		2/2 (1280)		2/6 (1280)	
Brucellacapt <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/3 (80-160)		0/2 (80)		0/7 (80)	
	Sangre	Suero	Sangre	Suero	Sangre	Suero
PCRQtr <sup>a</sup> (media ± DE)	3/3 (216 ± 83)	2/3 (541 ± 547)	2/2 (606 ± 750)	1/2 (354)	1/8 (55)	0/8 (0)

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/160$ ; <sup>c</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/320$ ; <sup>d</sup> Títulos recíprocos; ND: no hay datos.

### Paciente n° 3

Varón de 60 años, camionero, con antecedentes de dislipemia y obesidad, fue diagnosticado de brucelosis en el año 2000 mediante clínica compatible y serología para *Brucella* spp. Presentó un absceso hepático y fue tratado con estreptomicina 1g/24 h durante 14 días y doxiciclina 100mg/12 h durante cinco meses. En Julio de 2003, la serología para *Brucella* spp. fue positiva para la prueba RB, Coombs (1/640) y Brucellacapt® (1/320). El ensayo de PCRQtr fue positivo cuantificándose 72 copias/ml de sangre y 359 copias/ml de suero.

Durante el periodo de seguimiento de este paciente (Febrero 2004-Julio 2009) se analizaron 18 muestras (9 de sangre y 9 de suero). No se realizaron hemocultivos. La

prueba RB fue positiva en seis de las nueve muestras obtenidas (67%). La prueba de SAT fue negativa en las ocho muestras analizadas. Las seis muestras analizadas mediante la prueba de Coombs mostraron un título de anticuerpos igual a 1/2560. El título de anticuerpos detectado mediante la prueba Brucellacapt<sup>®</sup> osciló entre 1/80 y 1/320 para las nueve muestras analizadas. El ensayo de PCRQtr fue positivo en tres de las nueve muestras de sangre (33%) y cuatro de las 9 muestras de suero (44%), cuantificándose  $314 \pm 440$  copias/ml de sangre y  $450 \pm 259$  copias/ml de suero. Durante la realización del estudio se ha encontrado asintomático por lo que no ha precisado tratamiento antimicrobiano.

#### Paciente nº 4

Varón de 54 años, pastor durante muchos años, con antecedentes de esquizofrenia en tratamiento con risperidona, gammapatía biclonal idiopática y bronquitis crónica, tuvo brucelosis en tres ocasiones, la última en Diciembre de 2002 cuando se practicó exéresis de adenopatías en axila derecha. El estudio histológico mostró una linfadenitis granulomatosa necrotizada a partir de la cual se aisló *B. melitensis*. Recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg i.m. durante 15 días, con buena evolución clínica.

Cuatro años más tarde, acude a consulta por presentar molestias de tipo mecánico en el hombro derecho irradiado al codo derecho. No presenta signos de artritis ni de inflamación. La serología para *Brucella* spp. es positiva para la prueba RB, SAT (1/40) y Coombs (1/20480) y Brucellacapt<sup>®</sup> (1/5120). El ensayo de PCRQtr es negativo en sangre y positivo en suero cuantificándose 797 copias/ml. La ecografía muestra probables microcalcificaciones por lo que se le aconseja AINEs y relajantes musculares con mejoría de los síntomas. Durante los tres años y medio de seguimiento de este paciente (Marzo 2006–Junio 2009) se analizaron 36 muestras (18 de sangre y 18 de suero). No se realizaron hemocultivos. La prueba RB fue positiva en las 18 muestras de suero obtenidas. El título de anticuerpos detectado mediante la prueba de SAT osciló entre 1/40 y 1/160 para las 15 muestras analizadas. Para estas mismas muestras, la prueba de Coombs mostró un título de anticuerpos de 1/20480. La prueba Brucellacapt<sup>®</sup> mostró un título de anticuerpos que osciló entre 1/1280 y 1/5120. El ensayo de PCRQtr

fue positivo en siete de las 18 (39%) muestras de sangre con  $163 \pm 173$  copias/ml y seis de las 18 muestras de suero (33%) con  $423 \pm 289$  copias/ml. En la actualidad las artralgias en rodillas, manos y hombros son leves y ocasionales por lo que no precisa toma de analgésicos.

### **Paciente nº 5**

Varón de 44 años de edad, veterinario, en la actualidad trabaja como inspector de salud pública. Tiene antecedentes de prostatitis crónica, litiasis renal izquierda e hipertensión en tratamiento con enalapril. En 1990 se pinchó accidentalmente mientras vacunaba animales con la cepa *B. melitensis* Rev-1, motivo por el cual tomó doxiciclina 100 mg/24 h durante dos semanas. Tras completar el tratamiento experimentó un cuadro clínico compatible de sudoración y fiebre junto a serología positiva para *Brucella* spp. por lo que prolongó el tratamiento 40 días más. Ocho meses más tarde desarrolló una neuropatía motora multifocal con bloqueo de conducción de causa idiopática que respondía bien al tratamiento con inmunoglobulina intravenosa. En Diciembre de 2002 inició tratamiento con rifampicina 600 mg/24 h durante cuarenta días, seguido de ciclofosfamida i.v. 1 g cada 28 días durante seis meses, coincidiendo con mejoría en la movilidad de la mano izquierda.

En Junio de 2006 consultó el Servicio de Medicina Interna porque consideraba que su neuropatía está relacionada con el episodio de brucelosis aguda. La serología para *Brucella* spp. fue positiva mediante la prueba RB, Coombs (1/40) y Brucellacapt<sup>®</sup> (1/40). El ensayo de PCRQtr fue positivo en sangre con 461 copias/ml y negativo en suero. En Noviembre de ese mismo año inició un nuevo tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h más rifampicina 1g/24 h durante ocho meses, con mejoría transitoria de los síntomas. Durante el periodo de seguimiento de este paciente (Junio 2006–Septiembre 2009) se analizaron 49 muestras (24 de sangre, 24 de suero y una muestra de LCR). La muestra de LCR fue negativa tanto para la serología para *Brucella* spp. como para el ensayo de PCRQtr. En la Tabla 33 se muestran los resultados del hemocultivo, las pruebas sexológicas clásicas, la prueba Brucellacapt<sup>®</sup> y el ensayo de PCRQtr antes, durante y después del primer tratamiento antimicrobiano.

**Tabla 3.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt® y PCRQtr del paciente n° 5 correspondientes al primer tratamiento antimicrobiano.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
Hemocultivo <sup>a</sup>	0/3		0/1		ND	
RB <sup>a</sup>	4/5		1/4		0/4	
SAT <sup>b</sup>	0/5		0/4		0/2	
(rango) <sup>d</sup>	(0)		(0)		(0)	
Coombs <sup>c</sup>	0/5		0/4		0/2	
(rango) <sup>d</sup>	(40)		(40)		(40)	
Brucellacapt <sup>c</sup>	0/5		0/4		0/4	
(rango) <sup>d</sup>	(40)		(40)		(40)	
	Sangre	Suero	Sangre	Suero	Sangre	Suero
PCRQtr <sup>a</sup>	1/5	0/5	1/4	2/4	0/4	0/4
(media ± DE)	(461)		(4)	(613 ± 2104)		

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/160$ ; <sup>c</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/320$ ; <sup>d</sup> Títulos recíprocos; ND: no hay datos.

A los tres meses de la finalización del tratamiento, el paciente reanudó la misma pauta durante seis meses más, pues consideró que su mejoría clínica estaba relacionada con el tratamiento antimicrobiano. Durante el periodo correspondiente al segundo tratamiento, se analizaron mediante PCRQtr, 10 muestras (cinco de sangre y cinco de suero) de las cuales una muestra de suero fue positiva con 1125 copias/ml. Las muestras de sangre fueron negativas. En el último año de seguimiento post-tratamiento, se han analizado 12 muestras (seis de sangre y seis de suero), todas negativas mediante el ensayo de PCRQtr. La serología convencional no mostró títulos de anticuerpos detectables. La prueba Brucellacapt® presentó un título de anticuerpos constante de 1/40. En la actualidad, el paciente persiste con pérdida severa de fuerza en mano derecha y pie derecho y continúa en tratamiento crónico con dosis mensuales de IgG intravenosa.

### Paciente n° 6

Varón de 30 años de edad, estudiante, su padre es pastor y tiene ganado ovino. Diagnosticado de brucelosis en 1998 mediante clínica compatible y serología positiva para *Brucella* spp. recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h y rifampicina 1g/24 h con mejoría clínica. En noviembre de 2005 fue diagnosticado de orquitis brucelar aguda derecha. Desde entonces el paciente presenta artralgias migratorias con artritis de

rodilla derecha acompañada en ocasiones de escalofríos. En septiembre de 2006 los hemocultivos y el cultivo de LS fueron negativos. Las pruebas de Coombs y de Brucellacapt<sup>®</sup> mostraron un título de 1/40. El ensayo de PCRQtr también fue negativo en sangre y suero. Sin embargo, se detectó ADN de *B. melitensis* en la muestra de LS cuantificándose 1750 copias/ml. Recibió tratamiento antimicrobiano con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamina 240 mg/24 h i.m. durante siete días con buena respuesta clínica. Se obtuvieron dos muestras de sangre y dos de suero recogidas durante el tratamiento y el seguimiento post-tratamiento. El ensayo de PCRQtr fue negativo tanto en sangre como en suero. La prueba Brucellacapt<sup>®</sup> mostró de nuevo un título de 1/40.

### **Paciente nº 7**

Varón de 35 años de edad, trabaja en la construcción. Como antecedentes epidemiológicos refiere contacto con ganado de su padre, pastor. A los 26 años presentó un episodio de brucelosis aguda con sacroileitis que se trató con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg/24 h i.m. durante siete días con resolución de la sacroileitis. Desde entonces presenta dolor osteoarticular sobre todo en hombros y muñecas.

En Noviembre de 2003 acude a consulta del Servicio de Medicina Interna. Fue diagnosticado de hemocromatosis (homocigótico para la mutación C282Y) y se trató con sangrías sin mejoría de sus artralgiás. La serología para *Brucella* spp. es positiva para el RB, SAT (1/20), Coombs (1/1280), Brucellacapt<sup>®</sup> (1/320). Mediante el ensayo de PCRQtr se cuantificaron 136 copias/ml de sangre y 35 copias/ml de suero. Durante la realización del estudio, el paciente no recibió tratamiento antimicrobiano. Se considera que sus artralgiás pueden estar relacionadas con la hemocromatosis sin poder descartar brucelosis crónica. Durante los dos años y medio de seguimiento (Julio 2005-Febrero 2009) se han obtenido 16 muestras (8 de sangre y 8 de suero). La primera muestra obtenida fue positiva mediante el ensayo de PCRQtr en sangre y suero cuantificándose 136 copias/ml y 35 copias/ml, respectivamente. Al año y siete meses de seguimiento presentó de nuevo una muestra de suero positiva mediante el ensayo de PCRQtr cuantificándose 214 copias/ml. No se realizaron hemocultivos. La prueba RB

fue positiva en 3 de las 8 muestras obtenidas (37%). La prueba de SAT mostró un título de anticuerpos entre 1/20 y 1/40. La prueba de Coombs mostró un título de anticuerpos que osciló entre 1/640 y 1/1280. La prueba Brucellacapt<sup>®</sup> mostró un título de anticuerpos constante de 1/320.

### **Paciente n° 8**

Varón de 64 años, diagnosticado de brucelosis con espondilitis en el año 2000, recibió tratamiento primero con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y estreptomicina 1g/24 h durante 14 días y después sólo con doxiciclina 100 mg/12 h durante siete meses. Presenta dislipemia y obesidad.

En Diciembre de 2006, la serología para *Brucella* spp. fue positiva mediante la prueba RB, SAT (1/20), Coombs (1/640 y Brucellacapt<sup>®</sup> (1/320). El ensayo de PCRQtr fue positivo en sangre cuantificándose 96 copias/ml y negativo en suero. Durante los tres años y cinco meses de seguimiento (Diciembre 2006-Mayo 2009) se ha encontrado asintomático por lo que no ha precisado tratamiento. Durante este periodo se obtuvieron 16 muestras (ocho de sangre y ocho de suero). Al año de seguimiento, el ensayo de PCRQtr fue positivo en suero con 267 copias/ml. No se realizaron hemocultivos. La prueba RB fue positiva en 4 de las 7 (57%) muestras obtenidas. El rango del título de anticuerpos detectados osciló entre 1/20 y 1/40 para la prueba de SAT, entre 1/640 y 1/1280 para la prueba de Coombs. La prueba Brucellacapt<sup>®</sup> mostró un título invariable igual a 1/320.

### **Paciente n° 9**

Mujer de 40 años de edad, veterinaria, actualmente dirige un grupo de investigación y no está en contacto con ganado. Tiene antecedentes personales de pustulosis palmoplantar, asma y fibromialgia. Tuvo un episodio de brucelosis aguda en 1993 que fue tratado con doxiciclina 100 mg/12 h y rifampicina 600 mg/24 h durante 45 días. En 2002 comenzó a desarrollar dolor a nivel lumbar progresivo. En diciembre de 2006 presentó dolores en los hombros que con frecuencia se extendían a cuello, clavículas e intercostales y ocasionalmente descendían hacia los antebrazos.

En Marzo de 2007 se toma la primera muestra de sangre y suero y se incluye en el estudio. Durante el periodo de seguimiento (Marzo 2007–Julio 2009) se obtienen 38 muestras (19 de sangre y 19 de suero). La serología para *Brucella* spp. es positiva mediante la prueba de Coombs (1/80) y Brucellacapt® (1/160). El ensayo de PCRQtr es positivo tanto en sangre como en suero, cuantificándose 125 copias/ml y 94 copias/ml, respectivamente. Mediante RMN de la columna lumbar y las articulaciones sacroilíacas se diagnosticó de un foco de espondilitis inflamatoria en el platillo inferior de L5, de probable etiología brucelar. Recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h y rifampicina 600 mg/24 h durante tres meses con mejoría de los síntomas. En la Tabla 34 se muestran los resultados del hemocultivo, serología convencional, la prueba Brucellacapt® y el ensayo de PCRQtr antes, durante y después del primer tratamiento antimicrobiano.

**Tabla 4.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt® y PCRQtr del paciente n° 9 correspondientes al primer tratamiento antimicrobiano.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
Hemocultivos <sup>a</sup>	0/1		ND		ND	
RB <sup>a</sup>	0/3		0/5		0/5	
SAT <sup>b</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/3		0/5		0/5	
Coombs <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/3 (80)		0/5 (80)		0/5 (80)	
Brucellacapt <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/3 (160)		0/5 (160)		0/5 (80-160)	
PCRQtr <sup>a</sup>	<i>Sangre</i>	<i>Suero</i>	<i>Sangre</i>	<i>Suero</i>	<i>Sangre</i>	<i>Suero</i>
(media ± d.e)	1/3 (125)	2/3 (3344 ± 4596)	0/5	0/5	0/5	1/5 (1202)

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró positivo cuando el título fue ≥1/160; <sup>c</sup> Se consideró positivo cuando el título fue ≥1/320; <sup>d</sup> Títulos recíprocos; ND: no hay datos.

En enero de 2009, continúa con dolor en cintura escapular y reaparece el dolor a nivel lumbar por lo que reinicia un segundo tratamiento antimicrobiano con doxiciclina 200 mg/12 h y rifampicina 600 mg/24 h durante tres meses con mejoría de los síntomas. Durante este periodo una de las tres muestras de suero fue positiva mediante el ensayo de PCRQtr cuantificándose 702 copias/ml. A los quince días del final del tratamiento reanudó un tercer ciclo de doxiciclina 200 mg/12h y rifampicina 600 mg/24h durante



tres meses más. Durante este tiempo el dolor lumbar desapareció, sin embargo, el dolor en cintura escapular continuó. Mediante la prueba Brucellacapt<sup>®</sup> se analizaron seis muestras en las que se detectaron anticuerpos a títulos entre 1/80 y 1/160. En la actualidad, la paciente lleva seis días de seguimiento post-tratamiento, continúa con dolor lumbar y se sigue detectando ADN de *B. melitensis*.

### **Paciente n° 10**

La descripción de este caso se muestra en un artículo publicado por nuestro grupo en “Rapid diagnosis of human brucellosis by quantitative real-time PCR: a case report of brucellar spondylitis (2008) *Journal of Clinical Microbiology*; páginas 385-387.

## **PACIENTES CON SÍNTOMAS INESPECÍFICOS (GRUPO B)**

### **Paciente n° 11**

Mujer de 34 años de edad, trabaja en el servicio de limpieza de una granja de ciervos, tuvo su primer episodio de brucelosis aguda en 1996, diagnosticado mediante clínica y serología positiva para *Brucella* spp. Como antecedentes epidemiológicos refiere consumo de calostro. Desde entonces se queja de dolor cervical y sensación de agarrotamiento, cefalea tensional opresiva y poliartritis de pequeñas y grandes articulaciones (hombros, muñecas y rodillas).

En Junio de 2006 se obtiene la primera muestra de sangre y suero para su análisis mediante el ensayo de PCRQtr que resulta positiva en suero con 182 copias/ml. El hemocultivo es negativo. La serología para *Brucella* spp. es positiva para la prueba RB, SAT (1/80) y Coombs (1/80) y la prueba Brucellacapt<sup>®</sup> (1/320). Recibe tratamiento antimicrobiano con doxiciclina 100 mg/12 h y rifampicina 900 mg/24 h que interrumpe a la semana por presentar efectos secundarios (mareos, diarrea y vómitos). En febrero de 2007, inicia un nuevo ciclo de tratamiento con TMP-SMZ que suspende a los 20 días por reacción adversa con exantema y leucopenia. En mayo de 2007, se detecta ADN de *B. melitensis* en sangre y suero cuantificándose 653 copias/ml y 3888 copias/ml, respectivamente. Un mes después inicia tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante siete meses. En la Tabla 35 se muestran los resultados del hemocultivo,

serología convencional, la prueba Brucellacapt® y el ensayo de PCRQtr antes, durante y después del último tratamiento. En la actualidad, la paciente se encuentra bien.

**Tabla 5.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt® y PCRQtr del paciente n° 11.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
Hemocultivo <sup>a</sup>	0/2		ND		ND	
RB <sup>a</sup>	2/2		2/2		7/8	
SAT <sup>b</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/2 (0-40)		0/2		0/8	
Coombs <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/2 (0-40)		0/2		0/8	
Brucellacapt <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	2/2 (640-320)		2/2 (640)		7/8 (80-640)	
PCRQtr <sup>a</sup> (media ± DE)	<i>Sangre</i>	<i>Suero</i>	<i>Sangre</i>	<i>Suero</i>	<i>Sangre</i>	<i>Suero</i>
	1/2	1/2	1/2	1/2	0/8	0/8
	653	3888	2998	1900		

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/160$ ; <sup>c</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/320$ ; <sup>d</sup> Títulos recíprocos; ND: no hay datos.

## Paciente n° 12

Varón de 44 años de edad, veterinario, con antecedentes de brucelosis en 1990 y 1992, consulta la Unidad de Enfermedades Infecciosas en Marzo del 2003 asegurando tener brucelosis. Presenta un cuadro de sensación distérmica, con escalofríos, sudoración profusa y astenia marcada acompañada de dolores osteomusculares, sobre todo a nivel lumbar. La RMN muestra signos de discopatía en niveles D12-L1, L1-L2 y L4-L5. Los hemocultivos y la serología para *Brucella* spp. son negativos. Inicia tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg i.m/24 h por sospecha de brucelosis que suspende a los siete días por mejoría de los dolores a nivel lumbar, cervical y dorsal. Transcurridas tres semanas visita de nuevo la consulta debido a la persistencia de los dolores osteomusculares. Por entonces es diagnosticado de hepatitis por VHC.

En Noviembre de 2007 consulta el Servicio de Medicina Interna por persistencia de dolores articulares y musculares. En la segunda visita la muestra de sangre y suero obtenida es positiva mediante el ensayo de PCRQtr, cuantificándose 178 copias/ml y 132 copias/ml, respectivamente. Con posterioridad se analizan nueve muestras más de

sangre y suero mediante el ensayo de PCRQtr que resultan negativas. La serología convencional para *Brucella* spp. ha sido negativa en todo momento. El Brucellacapt<sup>®</sup> mostró un título de 1/40 en las 10 muestras de suero analizadas. Actualmente el paciente persiste con artromialgias y ha sido diagnosticado de SFC.

### **Paciente n° 13**

Varón de 57 años, trabajador en un matadero, actualmente está jubilado. Diagnosticado de brucelosis en 1997 mediante clínica y serología positiva para *Brucella* spp., recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/24 h durante 45 días y gentamicina 240 mg i.m/12 h durante 15 días. Refiere dolor osteoarticular en tobillos, rodillas y región lumbar con captación de tecnecio en gammagrafía ósea.

En 2001 fue diagnosticado de prostatitis crónica, probablemente relacionada con el episodio de brucelosis inicial. En Febrero de 2003, la serología para *Brucella* spp. es positiva para la prueba RB, Coombs (1/1280) y Brucellacapt<sup>®</sup> (1/320). El ensayo de PCRQtr es positivo en sangre con 6 copias/ml y negativo en suero. Entre Abril de 2001 y Junio de 2004 recibió de forma intermitente tres ciclos de doxiciclina 100 mg/24 h durante dos meses cada uno, con mejoría transitoria de los síntomas. En la Tabla 36 se muestran los resultados del hemocultivo, serología convencional, la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> y el ensayo de PCRQtr antes, durante y después del último ciclo de tratamiento. En la actualidad, el paciente continúa con dolor osteoarticular en tobillos, rodillas, y región lumbar que ha empeorado en los últimos meses y tiene dificultad para flexionar la espalda e incorporarse desde la posición de decúbito supino.

**Tabla 6.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt® y PCRQtr del paciente n° 13 correspondiente al último tratamiento antimicrobiano.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
Hemocultivo <sup>a</sup>	0/1		0/1		0/2	
RB <sup>a</sup>	1/1		1/1		8/14	
SAT <sup>b</sup>	0/1		0/1		0/11	
(rango) <sup>d</sup>					(20-40)	
Coombs <sup>c</sup>	1/1		1/1		11/11	
(rango) <sup>d</sup>	1280		1280		640-2560	
Brucellacapt <sup>c</sup>	1/1		1/1		14/14	
(rango) <sup>d</sup>	(320)		(320)		(160-320)	
PCRQtr <sup>a</sup>						
(media ± DE)	Sangre	Suero	Sangre	Suero	Sangre	Suero
	1/1	0/1	0/1	0/1	4/14	3/14
	(6)				(86 ± 44)	(765 ± 698)

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/160$ ; <sup>c</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/320$ ; <sup>d</sup> Títulos recíprocos.

## Paciente n° 14

Mujer de 49 años de edad, enfermera, con antecedentes de SFC y diabetes mellitus tipo I, fue diagnosticada de brucelosis mediante clínica y serología en 1997, recibiendo tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante dos meses. No refiere consumo de productos lácteos sin pasteurizar ni contacto directo con animales, aunque tiene ganado.

En Enero de 2006, la serología para *Brucella* spp. fue positiva para la prueba RB, SAT (1/80), Coombs (1/320) y Brucellacapt® (1/640). El ensayo de PCRQtr fue positivo en sangre con 3755 copias/ml y negativo en suero. Durante el periodo de seguimiento (Enero 2006-Octubre 2009) se analizan 50 muestras (25 de sangre y 25 de suero). En Marzo de 2006 recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 60 días, seguido de doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días más estreptomicina 1g/24 h durante 14 días. En Marzo de 2007 la paciente seguía sintomática, presentaba dolores osteoarticulares y fatiga, la serología para *Brucella* spp. fue positiva para la prueba RB, SAT (1/80) y Coombs (1/160). La paciente recibió dos nuevos ciclos de tratamiento. El primero consistió en doxiciclina 100 mg/12h más estreptomicina 1g/24h durante 45 días y 14 días, respectivamente. El segundo ciclo fue doxiciclina 100 mg/12h más cotrimoxazol (TMP 160 mg/12h y SMZ 800 mg/12h) durante tres meses, sin mejoría clínica de los síntomas. En la Tabla 37 se muestran los resultados del hemocultivo,

serología convencional, Brucellacapt<sup>®</sup> y el ensayo de PCRQtr antes, durante y después del último tratamiento antimicrobiano.

**Tabla 7.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt<sup>®</sup> y PCRQtr del paciente n° 14 correspondiente al último tratamiento antimicrobiano.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
Hemocultivo <sup>a</sup>	0/1		0/3		0/2	
RB <sup>a</sup>	1/1		4/4		8/9	
SAT <sup>b</sup>	0/1		1/4		3/3	
(rango) <sup>d</sup>	(80)		(80-160)		(160)	
Coombs <sup>c</sup>	1/1		4/4		1/3	
(rango) <sup>d</sup>	(320)		(320)		(160-320)	
Brucellacapt <sup>c</sup>	1/1		4/4		9/9	
(rango) <sup>d</sup>	(640)		(640)		(320-640)	
PCRQtr <sup>a</sup>	<i>Sangre</i>	<i>Suero</i>	<i>Sangre</i>	<i>Suero</i>	<i>Sangre</i>	<i>Suero</i>
(media ± DE)	1/1	0/1	0/4	0/4	1/10	3/10
	(3755)				(50)	(1887 ± 1760)

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró significativo cuando el título fue  $\geq 1:160$ ; <sup>c</sup> Se consideró significativo cuando el título fue  $\geq 1:320$ ; <sup>d</sup> Títulos recíprocos; nd: no detectable.

## Paciente n° 15

Mujer de 42 años, veterinaria, en la actualidad trabaja como inspectora de sanidad. Diagnosticada de brucelosis en dos ocasiones, la primera en 1994, por la que recibe tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h y rifampicina 900 mg/24 h que suspende a las tres semanas por epigastralgia. La segunda, dos años después, por la que recibe tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días más gentamicina 240 mg/24 h i.m. durante 7 días. Desde entonces refiere astenia intensa, artralgias sobretodo en rodillas y muñecas, mialgias difusas y dolor lumbar. En 2002, la serología para *Brucella* spp. es positiva para la prueba RB, SAT (1/1280) y Coombs (1/40). Inicia tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días más estreptomycinina 1g/24h i.m. durante 14 días, con mejoría progresiva de los síntomas. En Abril de 2003 la serología para *Brucella* spp. fue positiva para la prueba de SAT (1/40), Coombs (1/640) y Brucellacapt<sup>®</sup> (1/80). El ensayo de PCRQtr fue positivo en sangre con 112 copias/ml y negativo en suero. Durante el periodo de seguimiento (Abril 2003-Septiembre 2009) se obtuvieron 34 muestras (17 de sangre y 17 de suero). En 2006 comienza su valoración como paciente con SFC durante dos años. Recibe tratamiento con

doxiciclina 100 mg/12 h durante seis meses y se le realiza un seguimiento de 10 meses post-tratamiento. En la Tabla 38 se muestran los resultados del hemocultivo, serología convencional, el Brucellacapt<sup>®</sup> y la PCRQtr antes, durante y después de completar este tratamiento antimicrobiano.

**Tabla 8.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt<sup>®</sup> y PCRQtr del paciente n° 15.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
Hemocultivo <sup>a</sup>	ND		ND		ND	
RB <sup>a</sup>	0/5		0/6		0/4	
SAT <sup>b</sup>	0/5		0/5		0/2	
(rango) <sup>d</sup>	(0-40)		(40)		(0-20)	
Coombs <sup>c</sup>	3/3		4/5		2/2	
(rango) <sup>d</sup>	(640)		(160-640)		(320)	
Brucellacapt <sup>c</sup>	0/5		0/5		0/2	
(rango) <sup>d</sup>	(80-160)		(80-160)		(40-80)	
PCRQtr <sup>a</sup>	<b>Sangre</b>		<b>Sangre</b>		<b>Sangre</b>	
(media ± DE)	1/5		0/6		0/4	
	(112)		0/6		0/4	
	0/5		0/6		0/4	

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1:160$ ; <sup>c</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1:320$ ; <sup>d</sup> Títulos recíprocos; ND: no hay datos.

## Paciente n° 16

Varón de 35 años de edad, carnicero, ganadero y agricultor, con antecedentes de brucelosis en 1997, recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y estreptomycinina 1g/24 h durante 14 días. Desde entonces presenta poliartralgias erráticas y crónicas, sobre todo en el tercer dedo de la mano izquierda y segundo, tercer y cuarto dedo del pie izquierdo sin signos de artritis. El exámen radiológico no mostró alteraciones.

Desde Julio de 2006 se sigue a este paciente en el Servicio de Medicina Interna. La serología para *Brucella* spp. es negativa mediante las pruebas serológicas clásicas y la prueba de Brucellacapt. Sin embargo, el ensayo de PCRQtr fue positivo tanto en sangre como en suero cuantificándose 32 copias/ml y 366 copias/ml, respectivamente. Recibió tratamiento antimicrobiano con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días más estreptomycinina 1g/24 h durante 14 días. Tras el tratamiento antimicrobiano se siguió durante dos años y tres meses. En total se obtuvieron 28 muestras (14 de sangre y 14 de

suelo). En la Tabla 39 se muestran los resultados del hemocultivo, serología clásica, la prueba Brucellacapt<sup>®</sup> y el ensayo de PCRQtr antes, durante y después del último tratamiento antimicrobiano. En la última revisión, el paciente persiste con dolores torácicos y la sensación de inestabilidad sobretudo al incorporarse o al cerrar los ojos. La exploración neurológica fue normal.

**Tabla 9.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt<sup>®</sup> y PCRQtr del paciente n° 16.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
HC <sup>a</sup>	0/2		0/4		ND	
RB <sup>a</sup>	0/4		0/4		0/4	
SAT <sup>b</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/3		0/4		0/4	
Coombs <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/3		0/4		0/4	
Brucellacapt <sup>c</sup> (rango) <sup>d</sup>	0/4		0/4		0/6	
PCRQtr <sup>a</sup> (media ± d.e)	Sangre	Suero	Sangre	Suero	Sangre	Suero
	1/4	2/4	1/4	1/4	1/6	2/6
	(56)	(761 ± 51)	(1798)	(1614)	(99)	(84 ± 59)

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/160$ ; <sup>c</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/320$ ; <sup>d</sup> Títulos recíprocos; ND: no hay datos.

### Paciente n° 17

Varón de 37 años, trabajador de una industria quesera, diagnosticado de brucelosis con orquitis izquierda en 1991, recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y estreptomycin 1 g/24 h durante 21 días. Desde entonces presenta fatiga y artralgias en hombros, rodillas, ingles, lumbares y cadera derecha y ha sido diagnosticado de SFC.

En Octubre de 2007, la serología para *Brucella* spp. fue negativa tanto para las pruebas serológicas clásicas como para la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup>. Sin embargo, el ensayo de PCRQtr fue positivo en suero cuantificándose 121 copias/ml. Durante el año y diez meses de seguimiento de este paciente (Octubre 2007-Septiembre 2009) se obtuvieron 20 muestras (10 de sangre y 10 de suero) a partir de las cuales no se detectó de nuevo ADN de *B. melitensis*.

**Paciente n° 18**

Varón de 56 años, con antecedentes de brucelosis en 1975, recibió tratamiento con tetraciclinas en varias ocasiones que la mayoría de las veces interrumpió por molestias gástricas. También se le administró vacuna antibrucelar (antimelitensis) por vía subcutánea tras la que, según cuenta el paciente, presentaba fiebre y se encontraba muy mal. Desde entonces presenta fatiga, cefalea, dolor cervical y dolor en columna lumbar, rodillas y tobillos que aumenta con la movilización sin irradiación ciática, dolores que le producen insomnio. Diagnosticado de SFC (7 de 8 criterios CDC) y de un trastorno distímico.

En Febrero de 2008, la serología para *Brucella* spp. es positiva para la prueba de SAT (1/40), Coombs (1/2560) y Brucellacapt® (1/160). El ensayo de PCRQtr fue positivo en sangre con 25 copias/ml y negativo en suero. De acuerdo con el paciente, en Abril de 2008 inicia tratamiento con rifampicina 600 mg/24 h, excluyéndose el tratamiento con doxiciclina por problemas gástricos. Al mes de iniciar el tratamiento el paciente desarrolla un liquen plano oral por lo que se le indica su retirada. Durante el periodo de seguimiento (Febrero 2008- Junio 2009) se obtienen 28 muestras (14 de sangre y 14 de suero). En la Tabla 40 se muestran los resultados del hemocultivo, serología convencional, el Brucellacapt® y la PCRQtr antes, durante y después de este último tratamiento antimicrobiano. En la actualidad el paciente continúa sintomático.

**Tabla 10.** Resultados del hemocultivo, serología convencional, Brucellacapt® y PCRQtr del paciente n° 18 correspondiente al último tratamiento antimicrobiano.

Prueba	Basal		Tratamiento		Seguimiento	
Hemocultivo <sup>a</sup>	ND		ND		ND	
RB <sup>a</sup>	0/3		0/2		0/9	
SAT <sup>b</sup>	0/3		0/2		0/6	
(rango) <sup>d</sup>	(0-40)					
Coombs <sup>c</sup>	3/3		2/2		6/6	
(rango) <sup>d</sup>	(1280-2560)		(2560)		(320-1280)	
Brucellacapt <sup>c</sup>	0/3		0/2		0/6	
(rango) <sup>d</sup>	(160)		(160)		(80-160)	
PCRQtr <sup>a</sup>	Sangre Suero		Sangre Suero		Sangre Suero	
(media ± DE)	2/3		0/2		1/9	
	(398 ± 527)		0/2		(63)	
	0/3		0/2		(906)	

<sup>a</sup> Muestras positivas/total analizadas; <sup>b</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/160$ ; <sup>c</sup> Se consideró positivo cuando el título fue  $\geq 1/320$ ; <sup>d</sup> Títulos recíprocos; ND: no hay datos.



## SUJETOS ASINTOMÁTICOS (GRUPO C)

A continuación se detalla la descripción de 14 sujetos a modo de ejemplo.

### Sujeto n° 19

Mujer de 41 años de edad, con antecedentes de hemitiroidectomía, ama de casa, ayuda a su marido que es pastor. Contrajo la enfermedad en el año 2006 por contacto directo con ganado. Los hemocultivos fueron positivos en dos ocasiones. Recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y estreptomicina 1 g/24 h durante 14 días con resolución de los síntomas. Durante los dos años de seguimiento (Mayo 2008-Mayo 2010) se han analizado mediante el ensayo de PCRQtr seis muestras (tres de sangre y tres de suero) que han resultado negativas. Respecto a la serología para *Brucella* spp., todas las pruebas serológicas convencionales (RB, SAT y Coombs) han sido negativas. La prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> ha mostrado un título entre 1/40 y 1/80.

### Sujeto n° 20

Mujer de 50 años de edad, trabajadora de limpieza en una residencia de ancianos, presenta antecedentes de hipercolesterolemia. Diagnosticada de brucelosis en el año 2006 mediante clínica compatible y serología positiva para *Brucella* spp., recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg/24 h durante siete días con mejoría clínica. Durante el año y medio de seguimiento (Abril 2008-October 2009) se han obtenido 14 muestras (siete de sangre y siete de suero) que fueron todas negativas tanto mediante el ensayo de PCRQtr como mediante las pruebas serológicas clásicas. Sin embargo, el título de anticuerpos detectado mediante la prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> ha sido de 1/40 en todas las muestras de suero.

### Sujeto n° 21

Varón de 47 años, conductor de un camión de bomberos, sin antecedentes personales de interés. Diagnosticado de brucelosis aguda en 1997 con hemocultivos y serología positiva, contrajo la enfermedad por consumo de productos lácteos sin

pasteurizar. Recibió tratamiento antimicrobiano con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg/24 h i.v durante siete días.

Durante los dos años y seis meses de seguimiento (Septiembre 2007-Febrero 2010) se encuentra asintomático, la analítica general es normal y la serología convencional para *Brucella* spp. y el Brucellacapt<sup>®</sup> son negativos. Mediante el ensayo de PCRQtr se han analizado 14 muestras (siete de sangre y siete de suero) que fueron todas negativas.

### **Sujeto nº 22**

Mujer de 26 años de edad, estudiante, sin antecedentes personales de interés, diagnosticada de brucelosis en enero de 1998. Recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h y gentamicina 240 mg/24 h que suspendió a los 20 días por presentar adenopatías y toxicodermia. Seguidamente inició tratamiento con azitromicina pero reaparecieron las lesiones habonosas por lo que suspendió de nuevo el tratamiento. Inició entonces tratamiento con rifampicina 900 mg/24 h más gentamicina 240 mg/24h durante 45 días.

Durante los dos años de seguimiento (Septiembre 2007-Septiembre 2009) se han obtenido seis muestras (tres de sangre y tres de suero). Durante este periodo, la paciente refiere dolor de forma intermitente en glúteo derecho que atribuye a trastornos posturales. Tanto la serología convencional para *Brucella* spp. como la prueba Brucellacapt<sup>®</sup> y el ensayo de PCRQtr han sido negativos.

### **Sujeto nº 23**

Varón de 59 años de edad, agricultor, con antecedentes personales de HTA, dislipemia, obesidad, DM II y disfunción erectil. Diagnosticado de brucelosis en enero de 1997 con sacroileitis izquierda y hemocultivos positivos. Recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días más gentamicina 240 mg/24h i.v durante siete días. En Marzo de ese mismo año presentó una recidiva clínica y microbiológica por lo que recibió la misma pauta de tratamiento antimicrobiano.

Durante los seis meses de seguimiento (Febrero 2009–Agosto 2009) se encuentra asintomático. Únicamente refiere molestias en glúteo izquierdo con el esfuerzo. La analítica general es normal excepto para la GGT que está elevada en un rango de 54-61 U/L (rango normal, 5-36). Se han analizado ocho muestras (cuatro de sangre y cuatro de suero). La serología convencional para *Brucella* spp. y el ensayo de PCRQtr fueron negativos en todas las muestras. La prueba Brucellacapt<sup>®</sup> mostró un título de 1/40 en las cuatro muestras de suero analizadas.

#### **Sujeto n° 24**

Varón de 51 años, trabaja en la construcción, donante de sangre, sin antecedentes personales de interés. Anteriormente fue conductor de un tractor y ayudante de un pastor. Refiere haber consumido queso de cabra sin pasteurizar. Diagnosticado de brucelosis en Abril de 1997 con hemocultivos positivos, recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg/24h i.v. durante siete días. En Junio de ese mismo año presenta recidiva microbiológica por lo que recibe la misma pauta de tratamiento.

Durante los nueve meses de seguimiento (Enero 2009-Octubre 2009) se encuentra asintomático. La analítica general es normal excepto los niveles de pcr que se elevan ligeramente en una ocasión con 8,1 mg/L (rango normal, 0-5). Se obtienen ocho muestras (cuatro muestras de sangre y cuatro de suero). La prueba RB es positiva en una de las cuatro muestras, la prueba SAT muestra un título de 1/20 y la prueba Coombs de 1/160. Los títulos de anticuerpos detectados mediante la prueba Brucellacapt<sup>®</sup> oscilaron entre 1/40 y 1/80.

#### **Sujeto n° 25**

Varón de 58 años, presenta antecedentes de hipercolesterolemia, bronquitis crónica, quistes prostáticos, actualmente trabaja en la construcción. Contrajo la brucelosis en Abril 1997 por contacto directo con ganado. Los hemocultivos fueron positivos y fue tratado con doxiciclina 100 mg/12h durante 45 días y gentamicina 240 mg/24h i.m. durante siete días. En junio de ese mismo año presenta una recidiva clínica y microbiológica por lo que recibe de nuevo la misma pauta de tratamiento.

Durante el año y seis meses de seguimiento (Octubre 2007- Abril 2009) se encuentra asintomático. La analítica general es normal. Se obtuvieron ocho muestras (cuatro de sangre y cuatro de suero). La serología convencional para *Brucella* spp. y el ensayo de PCRQtr fueron negativos. La prueba Brucellacapt® mostró un título entre 1/40 y 1/80.

### **Sujeto n° 26**

Mujer de 48 años, ama de casa, ayuda a su marido en el campo y consume leche de cabra sin pasteurizar. Diagnosticada de brucelosis en 1997, recibió tratamiento antimicrobiano con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg/24 h i.m. durante siete días.

Durante los diez meses de seguimiento (Enero 2009- Octubre 2009) se encuentra bien aunque refiere cansancio para hacer sus tareas, probablemente relacionado con su anemia ferropénica en tratamiento. Por lo demás la analítica general es normal. Se obtuvieron ocho muestras (cuatro muestras de sangre y cuatro de suero). Las pruebas RB y SAT fueron negativas. Mediante la prueba de Coombs se obtuvo un título de anticuerpos igual a 1/160. La prueba de Brucellacapt® mostró un título de 1/80 en las cuatro muestras analizadas. El ensayo de PCRQtr fue positivo en 1 de las cuatro muestras de sangre analizadas (25%) con 228 copias/ml.

### **Sujeto n° 27**

Varón de 35 años, auxiliar administrativo, diagnosticado de brucelosis en 1997 junto con siete familiares, enfermedad que contrajeron por ingerir queso fresco sin pasteurizar. Recibió tratamiento antimicrobiano con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg/24 h i.m. durante siete días. Como antecedentes personales destaca una infección pasada por CMV.

Durante los dos años de seguimiento (Noviembre 2007-Octubre 2009) se encuentra asintomático. Se obtuvieron 10 muestras (cinco de sangre y cinco de suero). Todas las pruebas de laboratorio realizadas (serología convencional, Brucellacapt® y PCRQtr) fueron negativas.

**Sujeto nº 28**

Varón de 41 años, enfermero, sin antecedentes personales de interés. Fue diagnosticado de brucelosis en 1997 con hemocultivos positivos. Adquirió la enfermedad por consumo de productos lácteos sin pasteurizar. Recibió tratamiento antimicrobiano con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg/24 h i.m durante siete días.

Durante el año y seis meses de seguimiento (Noviembre 2007-Mayo 2009), el paciente asegura estar asintomático aunque presenta ligeras molestias en rodillas sobre todo tras hacer ejercicio físico. Se han analizado seis muestras (tres de sangre y tres de suero). Todas las pruebas de laboratorio realizadas (serología convencional, Brucellacapt<sup>®</sup> y PCRQtr) fueron negativas.

**Sujeto nº 29**

Varón de 83 años de edad, pastor, con antecedentes personales de fiebre tifoidea, paludismo y varios episodios de brucelosis aguda, el último en 1997 con probable endocarditis mitral, por los que fue tratado con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y estreptomicina 1g/24 h durante 21 días seguido de doxiciclina 100 mg/12 h durante tres meses y rifampicina 900 mg/24 h los primeros 21 días. En el año 2002 presenta una doble lesión aórtica que precisa implante de prótesis biológica y una lesión doble mitral con estenosis mitral moderada e insuficiencia mitral ligera además de varios episodios de fibrilación auricular paroxística en tratamiento con sintrom, adiro, trangorex y furosemida. Presenta también bronquitis crónica, dislipemia e hiperuricemia en tratamiento con zyrolid 300.

Durante el año de seguimiento (Octubre 2008-Septiembre 2009) se encuentra asintomático y se obtienen 10 muestras (cinco de sangre y cinco de suero). La prueba RB fue positiva en 3 de las 5 muestras (60%), la prueba de SAT fue positiva en una ocasión (20%) con un título de anticuerpos igual a 1/40. La prueba de Coombs fue positiva en tres muestras (60%) con un título de anticuerpos igual a 1/640. La prueba de Brucellacapt<sup>®</sup> mostró un título igual a 1/160 en las cinco muestras. El ensayo de

PCRQtr fue positivo en las dos primeras muestras que se tomaron. La primera vez en sangre con 678 copias/ml y la segunda en suero con 125 copias/ml.

### **Sujeto n° 30**

Mujer de 42 años de edad, sin antecedentes personales de interés. Fue diagnosticada de brucelosis aguda con hemocultivos positivos en el año 1997, enfermedad que contrajo por consumo de lácteos sin pasteurizar. Recibió tratamiento con doxiciclina 100 mg/12 h durante 45 días y gentamicina 240 mg/24 h durante 7 días. Durante los cinco meses de seguimiento (Octubre 2008-Marzo 2009) se han analizado seis muestras (tres de sangre y tres de suero). Todas las pruebas de laboratorio realizadas (RB, SAT, Coombs, Brucellacapt® y PCRQtr) fueron negativas.

### **Sujeto n° 31**

Varón de 64 años de edad, encargado de una finca, con antecedentes personales de brucelosis en el año 1997. Como enfermedades asociadas presenta HTA, una cardiopatía en tratamiento con adiro, acovil, uniket, dilutol y cepap. Intervenido en varias ocasiones de abscesos perianales y de una orquectomía. Durante los siete meses de seguimiento (Noviembre 2008-Junio 2009) se obtienen siete muestras (tres de sangre, tres de suero y una biopsia de válvula aórtica). El ensayo de PCRQtr y la serología convencional para *Brucella* spp. fueron negativos. La prueba Brucellacapt® mostró un título igual a 1/40.

### **Sujeto n° 32**

Varón de 30 años, diagnosticado de brucelosis aguda con sacroileitis tratada en el año 2001 sin otras enfermedades asociadas de interés. Durante los once meses de seguimiento (Enero 2009-Noviembre 2009) se han analizado diez muestras (cinco de sangre y cinco de suero). La serología convencional para *Brucella* spp. es negativa. La prueba Brucellacapt® mostró un título de 1/40 en cuatro de las cinco muestras (80%). En la tercera visita, el ensayo de PCRQtr fue positivo en la muestra de sangre cuantificándose 140 copias/ml.

## HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Servicio de Medicina Interna  
Complejo Hospitalario Universitario Universitario de Albacete  
C/Hermanos Falcó 37  
02006 Albacete  
Tlf. 967597100 ext 7162

### **TÍTULO DEL ESTUDIO:**

“Importancia de la carga bacteriana, detectada mediante PCR cuantitativa en tiempo real, en la evolución de los pacientes con brucelosis crónica”

**Investigador responsable del estudio:** Dr. Javier Solera Santos

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal pretende profundizar en el diagnóstico de la brucelosis humana.

En este estudio participan el Hospital General Universitario de Albacete su Unidad de Investigación, y el Hospital Comarcal de Hellín (Albacete).

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de marcadores para el diagnóstico de la brucelosis podría beneficiar en un futuro a otros pacientes y podrá contribuir a un mejor conocimiento y tratamiento de esta enfermedad.

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que Ud. precise y la relación con el Equipo Médico que le atiende no va a verse afectada. Si usted decide participar, se le realizará, coincidiendo con un análisis rutinario de sangre, una extracción adicional de sangre (15cc) para obtener las muestras de ADN y suero. El ADN es un elemento que está presente en todas sus células y en las de la bacteria causante de su enfermedad. El poder detectar este ADN en su sangre nos pueden ayudar a explicar por qué algunas personas desarrollan la enfermedad incluso después de finalizado el tratamiento. La toma de muestra de sangre puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y le puede ocasionar un pequeño hematoma que desaparece en pocos días. Más raramente mareo en el momento de la extracción de sangre.

## **PRUEBAS QUE SE REALIZARÁN:**

Si Vd da su autorización, se le realizará, coincidiendo con un análisis rutinario de sangre, una extracción adicional de sangre (3 ml) para su posterior análisis.

La toma de muestra de sangre puede provocar sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y le puede ocasionar un pequeño hematoma que desaparece en pocos días. Más raramente mareo en el momento de la extracción de sangre.

Las muestras de sangre obtenidas no serán utilizadas para ningún otro procedimiento para el que no haya dado previamente sus consentimiento previo.

## **CONSENTIMIENTO:**

Se le pedirá su consentimiento para que con su sangre se hagan 2 cosas:

1- Extracción del ADN de la bacteria presente en las células de su sangre y cuantificación mediante PCR a tiempo real del número de bacterias.

2. - Es probable que en un futuro se descubran nuevos métodos diagnósticos moleculares. Por ello se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra. Si Ud. acepta autorizar este almacenamiento, se eliminará de la muestra todos los vínculos con su identidad, antes de guardarla, y no será posible llegar a conocer su identidad a partir de ella.

Ud. puede aceptar que sólo se estudien en su muestra de sangre el número de bacterias descrito en el punto 1.

Ud. puede aceptar que sólo se guarde su muestra tal y cómo se describe en el punto 2.

Ud. puede aceptar las dos propuestas.

Ud. puede decidir no aceptar ninguna.

Si Ud. acepta sólo los estudios descritos en el punto 1, su muestra se destruirá después completar la prueba. Si Ud. acepta que se guarde esa muestra para futuros estudios



como se describe en el punto 2, el Investigador garantizará que guardará y utilizará la muestra hasta que ya no quede más ADN. Ud. debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando qué parte del estudio acepta y firmando este documento, antes de la obtención del ADN. Si cambia de opinión después de dar sangre para el estudio, Ud. puede pedir que se destruya su sangre y su ADN. No obstante, si ha aceptado que se guarde su muestra de ADN (punto 2), debe pedir que se destruya su muestra de sangre antes de que termine el estudio. Cuando finalice el estudio, se retirará el vínculo que liga a su muestra de ADN con su identificación. Una vez se haya destruido este vínculo, no será posible encontrar su muestra y por tanto no podrá ser destruida.

Al tratarse de un estudio molecular, los datos que se obtengan del estudio no le serán comunicados ni a Ud. ni a su médico. Los resultados serán analizados por grupos o subgrupos de científicos. Se le garantiza la absoluta confidencialidad de los datos obtenidos del estudio.

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial. Todos los de la muestra de sangre recibirán un número y nunca el equipo investigador que lleve a cabo el análisis conocerá su identidad. Se le ha dicho a su médico que guarde esta Hoja de Información y la Hoja de su Consentimiento otorgado con su firma en un archivo especial seguro que no forma parte de su historia clínica. Su historia clínica no contiene ninguno de sus resultados. Representantes del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital y de las Autoridades Sanitarias Españolas podrán tener acceso a sus registros médicos con el fin de controlar y garantizar la correcta realización del estudio.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, Congresos Médicos o publicaciones científicas, sin embargo se mantendrá una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.

Si Ud. precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con el Investigador principal, el Dr. Javier Solera Santos, del Servicio de Medicina Interna del Hospital General Universitario de Albacete. Telf. 967 59 71 62



## MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Complejo Hospitalario Universitario Universitario de Albacete  
C/Hermanos Falcó 37  
02006 Albacete  
Tlf. 967597100 ext 7162

### TÍTULO DEL ESTUDIO:

Importancia de la carga bacteriana, detectada mediante PCR cuantitativa en tiempo real, en la evolución de los pacientes con brucelosis crónica

**Investigador responsable del estudio:** Dr. Javier Solera Santos

La siguiente información describe las características del estudio que se va a realizar. Por favor, lea atentamente esta hoja y no dude en preguntar cualquier cosa sobre la información presentada a continuación.

1. Yo ..... declaro bajo mi responsabilidad que he leído la Hoja de Información sobre el estudio y acepto participar en este estudio genético.
2. Se me ha entregado una copia de la Hoja de Información al paciente y una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado las características y el objetivo del estudio. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
3. Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificará mi sangre y mis muestras de ADN con un número único.
4. Soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento del estudio por cualquier razón, sin que tenga ningún efecto sobre mi tratamiento médico futuro. Entiendo que una vez se haya retirado el número de identificación de la muestra, no se podrá relacionar conmigo, de forma que no se podrá destruir.

5. Entiendo que el objetivo del estudio es determinar si existe un nivel o persistencia en el tiempo de ADN de *Brucella melitensis* tras finalizar el tratamiento y que no se espera que se entreguen a mí ni a mi médico del estudio los resultados y que no se espera que se entreguen a mí ni a mi médico del estudio los resultados.

**Punto 1.-** Yo DOY / No DOY mi consentimiento voluntariamente para que se pueda realizar el estudio referente a la brucelosis que padezco en mi muestra de sangre.

**Punto 2.-** Yo DOY / No DOY mi consentimiento voluntariamente para que se pueda realizar el estudio referente a la enfermedad de brucelosis que padezco en mi muestra de ADN.

**Punto 3.-** Yo DOY / No DOY mi consentimiento voluntariamente para que se guarde mi muestra de sangre y/o ADN.

Consiento en participar voluntariamente en el apartado marcado de este estudio.

Fecha:

Firma del paciente:

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio y sus dos apartados y los riesgos y beneficios potenciales al sujeto cuyo nombre aparece escrito más arriba. El sujeto consiente en participar por medio de su firma fechada en persona.

Fecha:

Firma del Investigador o la persona que proporciona la información y el consentimiento:

Nombre en letra impresa del Investigador o la persona designada de proporcionar la información.

## **DIFUSIÓN DE RESULTADOS DE ESTA TESIS**

Parte del contenido de esta Tesis Doctoral ha sido publicado en los siguientes trabajos:

### **PUBLICACIONES:**

Artículos:

- Castaño MJ and Solera J (2009) “Chronic brucellosis and persistence of *Brucella melitensis* DNA”. *J Clin Microbiol.* 42: 2084-2089.
- Navarro-Martínez A, Navarro E, Castaño MJ, Solera J (2008) “Rapid diagnosis of human brucellosis by quantitative real-time PCR: a case report of brucellar spondylitis”. *J Clin Microbiol.* 46:385-387.

Capítulos de libros:

- Solera J and Castano MJ. Brucellosis (2010). In: *Public Health and Infectious Diseases* pp.: 112-124. Elsevier.
- Solera J and Castano MJ. Infectious Diseases: Brucellosis (2008). In: *International Encyclopedia of Public Health*, pp.: 357-369. Elsevier.

### **PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS:**

Presentación ORAL:

- Castaño MJ, Navarro E, Solera J. “Comparison between serum and whole blood samples. LightCycler quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-PCR) assays for the diagnosis of human brucellosis”. 1<sup>st</sup> International Meeting on the treatment of human brucellosis. 7-10 Noviembre de 2006; Ioannina, Grecia.

Presentación POSTER:

- Castaño MJ, Navarro E, Andicoberry M, Lorente S, Solera J. “Comparative evaluation of four serological methods and a quantitative real-time PCR assay in asymptomatic subjects with a previous history of brucellosis”. 20<sup>th</sup> European

Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 10-13 Abril de 2010; Viena, Austria.

- Castaño MJ, Navarro E, Segura JC, Alfaro-Martínez E, Muñoz MD, Martínez AI, Lorente S, Solera J. “*Brucella melitensis* DNA persistence in patients with chronic brucellosis”. 18<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 19-22 Abril de 2008; Barcelona, España.
- Castaño MJ, Solera J. “Chronic brucellosis and persistence of *Brucella melitensis* DNA”. Brucellosis 2008 International Research Conference. 10-13 Septiembre de 2008; Londres, Reino Unido.
- J Solera, MJ Castaño, E Navarro. Molecular methods in the diagnosis of human brucellosis. 16<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). 1-4 Abril de 2006. Niza, Francia.

